MARIA ANGÉLICA MACIEL MARTINHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ALGUNS REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS CAESALPINACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE, PRESENTES NO CERRADO DA REGIÃO DE TRÊS LAGOAS (MS).

736

1910001421

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

MARIA ANGÉLICA MACIEL MARTINHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ALGUNS REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS CAESALPINACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE, PRESENTES NO CERRADO DA REGIÃO DE TRÊS LAGOAS (MS).

BIBLIOTECA
Unesp - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
S. J. Rio Preto
T. 1421/05

Tese de doutorado, apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do Título de Doutor em Genética.

São José do Rio Preto-SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de São José do Rio Preto

MARIA ANGÉLICA MACIEL MARTINHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ALGUNS REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS CAESALPINACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE, PRESENTES NO CERRADO DA REGIÃO DE TRÊS LAGOAS (MS).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

Tese de doutorado, apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do Título de Doutor em Genética.

São José do Rio Preto-SP
2005

Ferreira, Maria Angélica Maciel Martinho.
Caracterização citogenética em alguns representantes das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae, presentes na região de Três Lagoas (MS) / Maria Angélica Maciel Martinho Ferreira. – São José do Rio Preto : [s.n.] , 2005
64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Leguminosa. 2. Cromossomos vegetais. 3. Bandamento. 4. Hibridação *in situ*. 5. Evolução cariotípica. 6. DNAr 45S. I. Marin-Morales, Maria Aparecida. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

Às minhas filhas Tatiana e Ana Gabriela, o amor mais puro e verdadeiro.

MARIA ANGÉLICA MACIEL MARTINHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM ALGUNS REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS CAESALPINACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE, PRESENTES NO CERRADO DA REGIÃO DE TRÊS LAGOAS (MS).

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA:_____
Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

1ºEXAMINADOR:_____
Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

2ºEXAMINADOR:_____
Profa. Dra. Mônica Rosa Bertão

3ºEXAMINADOR:_____
Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela

4ºEXAMINADOR:_____
Prof. Dr. Paulo Bahiense Ferraz Filho

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível graças a colaboração e dedicação de várias pessoas, às quais dedico os meus sinceros agradecimentos.

À profa.Dra.Marin-Morales, pela orientação, dedicação e extrema paciência, durante a minha formação;

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Maria Tercília de Azeredo Oliveira, Profa. Dra. Mônica Rosa Bertão, Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela, Prof. Dr. Paulo Bahiense Ferraz Filho;

Ao Prof. Dr.André Luis Laforga Vanzela, pela oportunidade, confiança e total apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos;

Ao Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela aprovação de meu afastamento para a realização do curso.

Ao Departamento de Biologia da UNESP-Campus Rio Claro, pelo uso de equipamentos e uso de reagentes.

À minha família, pela força, paciência e cuidados com minhas filhas.

Â Rosana Ferro pela amizade e simpatia que sempre me dedicou.

As colegas do laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UNESP-Rio Claro, em especial a Rogilene.

A minha eterna gratidão a Thaís Christina, Bruna, José Augusto e Eduardo pela disposição, desprendimento e impagável apoio nesta etapa final.

SUMÁRIO

RESUMO iii

ABSTRACT v

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 FILOGENIA E EVOLUÇÃO 3

1.2 NÚMERO CROMOSSÔMICO 4

1.3 POLIPLOIDIA 5

1.4 A IMPORTÂNCIA DA CITOGENÉTICA NO ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE PLANTAS 8

1.5 ESTUDO CITOGENÉTICO EM LEGUMINOSAS 11

ARTIGO 1 16

ARTIGO 2 31

ARTIGO 3 44

2. CONCLUSÕES 57

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

RESUMO

O cerrado brasileiro é uma formação vegetal que possui vegetação peculiar tanto no aspecto econômico quanto em riqueza taxonômica. Este ecossistema é caracterizado por espécies de hábitos diversos, com representantes no extrato herbáceo, arbustivo e arbóreo. Dentre os grupos vegetais do cerrado, destacam-se algumas das famílias, como é o caso das Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae, também conhecidas, genericamente, como leguminosas. Essas famílias juntas apresentam 690 gêneros e, aproximadamente, 17.600 espécies distribuídas neste ambiente. Dentre as espécies de leguminosas, 28,9% apresentam um número cromossômico básico x=8 e 47,17% múltiplos deste valor. A utilização de técnicas citogenéticas convencionais de coloração, técnicas de bandamento cromossômico C e CMA/DAPI, bem como de citogenética molecular, como a hibridação *in situ*, são importantes ferramentas para avaliar, com riqueza de detalhes, os cromossomos de diferentes grupos vegetais ou de espécies relacionadas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente, algumas espécies das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae do cerrado de Três Lagoas-MS, pelas técnicas de coloração convencional, de bandamento por fluorocromos base específicos e por hibridação *in situ*, para determinar o número, a morfologia, a distribuição de bandas de seqüências específicas, além de avaliar a localização de sítios de DNAr 45S. Neste estudo, foram realizadas análise citogenéticas por técnicas de coloração convencional para doze espécies de leguminosas, onde foi observada uma variação cromossômica de 2n=16 a 2n=28. Os cariótipos foram simétricos e constituídos por cromossomos pequenos. O bandamento com fluorocromos base específicos foi aplicado em seis espécies. O qual evidenciou apenas bandas $CMA_3^+/DAPI^-$ para todas as espécies analisadas, evidenciando nestes locais seqüências repetitivas ricas em GC. A hibridação *in situ,* foi realizada com nove espécies e mostrou uma variação de 2 a 8 sítios de DNAr45S por cariótipo. Estas frações apareceram preferencialmente dispostas nos braços curtos dos cromossomos, sempre nas pontas. Algumas espécies (*Hymenaea stigonocarpa* e *Plathymenia reticulata*) apresentaram 2 sítios pouco evidentes.

Palavras chave: Bandamento, DNAr 45S, evolução cariotípica, hibridação *in situ* , leguminosa e número cromossômico.

ABSTRACT

Brazilian "savanna" is a ecossistem that possesses peculiar vegetation in both aspects: economic and taxonomic opulence. This ecosystem presents species of various habits: herbs, scrub and tree. Between those species some families are more abundant like Caesalpinaceae, Fabaceae and Mimosaceae; together those families present 690 genus and around 17600 species in this habitat. Among the leguminosas species 28,9% have x=8 as the basic chromosome number and 47,17% have multiples of this value. Conventional citogenetics techniques, fluorocromes, C-banding and molecular citogenetics, like *in situ* hybridization, are important tools to evaluate with detail the chromosomes of different species of plants. The aim of this work is to characterize the chromosomes of some species of the families Caesalpinaceae, Fabaceae and Mimosaceae from Três Lagoas – MS "savanna", applying conventional techniques, fluorocrome banding and *in situ* hibridization, to determinate de chromosome number, their morphology and the distribution of specific sequences, besides the localization of rDNA 45S sites. In this study 12 species were analyzed through conventional techniques and a chromosome variation between 2n=16 and 2n=28 was observed. The caryotipes were symmetric and constituted of small chromosomes. Fluorochrome banding was applied in 6 species and demonstrated the presence of CMA3+/DAPI$^-$ band in all analyzed species. Nine species were analysed with *in situ* hybritization and demonstrated a variation between 2 and 8 sites of rDNA 45S in each caryotipe, preferentially located on the short arms of the chromosomes. *Hymenaea*

stigonocarpa and *Plathymenia reticulata* presented not clear sities, being necessary more detailed studies to confirm those records.

Key – words: Banding, chromosome number, *in situ* hybritization, leguminosa, rDNA 45S.

1. INTRODUÇÃO

Os cerrados ocupam grande parte do território nacional, representando entre 20 a 25% da área total do Brasil. Essa formação vegetal está distribuída entre os estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rondônia, São Paulo, Paraná e Tocantins, além do Distrito Federal. No Brasil Central, as áreas de cerrado ocupam, aproximadamente, dois milhões de km^2, estando geralmente localizados em planaltos de topografia planas onde as condições climáticas mostram-se menos severas (FERRI, 1977). O cerrado possui uma vegetação peculiar que se apresenta em ordem crescente de biomassa como campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado e cerradão, sendo as quatro primeiras formações campestres e a última florestal (COUTINHO, 1990).

O cerrado constitui um importante sistema, tanto no aspecto econômico quanto ecológico. Apesar da homogeneidade fisionômica da sua vegetação, os levantamentos florísticos já realizados mostraram uma grande riqueza em número de espécies e uma grande variação na composição florística.

Podemos descrever essa vegetação como constituída por dois grupos, essencialmente, opostos: o das lenhosas permanentes, que reúne todas as árvores e arbustos, e o das efêmeras, que compreende inúmeras plantas

herbáceas (FERRI, 1977). A flora do cerrado, segundo Rizzini (1963) e Heringer et al. (1977), é bastante diversificada, com algumas centenas de espécies (cerca de 1000 a 2000 espécies arbustivo-arbóreas e 2000 a 6000 espécies herbáceas).

Devido a sua localização, o cerrado compartilha espécimes com a maioria dos outros biomas brasileiros (floresta amazônica, caatinga e floresta atlântica), possuindo, uma biodiversidade comparável a estas formações.

Dentre os grupos encontrados neste ecossistema, algumas famílias destacam-se, não só pelo elevado número de representantes, mas pela sua importância sócio econômica como, por exemplo, as famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Em geral, as espécies dessas três famílias são, genericamente, conhecidas como leguminosas, e juntas compreendem 690 gêneros e aproximadamente 17.600 espécies (HUTCHINSON, 1964).

Muitos taxonomistas consideram a família Leguminosae dividida em três sub-famílias: Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Outros, porém, consideram estes três grupos como famílias distintas, por considerá-las botanicamente diferentes. Estudos sobre o número de cromossomos podem contribuir para essa discussão, servindo de argumentação na escolha da unidade taxonômica a ser considerada deste grupo de plantas.

Os representantes das famílias Caesalpiniaceae e Mimosaceae são, predominantemente, de regiões tropicais e sub-tropicais do hemisfério Sul, com poucas espécies se desenvolvendo nas regiões temperadas. As espécies da família Fabaceae ocorrem em zonas temperadas e tropicais (HUTCHINSON, 1964).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Apesar de pertencerem a um grupo natural bem delimitado e característico, estas famílias apresentam uma grande variação morfológica interespecífica, além de uma acentuada variação de hábito. São encontradas neste grupo desde grandes árvores e arbustos até ervas e trepadeiras. Esta grande diversidade confere a essas famílias uma necessidade em se estudar os seus processos evolutivos.

1. 2. FILOGENIA E EVOLUÇÃO DAS LEGUMINOSAS

Acredita-se que as leguminosas tenham surgido no período Cretáceo da era Cenofítica, coincidindo com o aparecimento das angiospermas e dos mamíferos (BURKART, 1952).

Por apresentarem grande variabilidade morfológica, ampla distribuição geográfica, grande variação numérica dos cromossomos, além de ser um dos mais numerosos grupos do reino vegetal, as leguminosas constituem um material bastante interessante para estudos de evolução e filogenia (BANDEL, 1972).

A filogenia das leguminosas foi, inicialmente, estudada com base em dados morfológicos (BURKART,1952) e dados de variação numérica de cromossomos (SENN, 1938; TURNER & FEARING, 1959).

Os estudos filogenéticos realizados e descritos na literatura, quanto à classificação botânica das espécies, gêneros e tribos das leguminosas são baseados nas publicações de Hutchinson (1964), que propõe uma classificação moderna para as leguminosas, criando novos gêneros e tribos.

As famílias Caesalpiniaceae, e Mimosaceae foram consideradas por Senn (1938) mais primitivas que a família Fabaceae. O autor considera que as Fabaceae se originaram de espécies ancestrais com o número básico x=8 e, a partir destas, formaram-se quatro ramos evolutivos dando origem à maioria das tribos atuais.

Turner & Fearing (1959) sugeriram algumas modificações ao esquema filogenético proposto por Senn (1938). Os primeiros autores basearam seus estudos filogenéticos em um número de espécies de leguminosas maior do que as estudadas por Senn (1938). Este último autor baseou seu estudo filogenético no conhecimento citológico de 434 espécies, enquanto Turner & Fearing (1959) tiveram como base as descrições de Darlington & Wylie (1955), que analisaram citogeneticamente 1000 espécies de leguminosas.

Estudos sobre os números de cromossomos das leguminosas têm despertado a atenção de vários pesquisadores, ocorrendo um aumento significativo de trabalhos publicados nesta área.

1. 3. NÚMERO CROMOSSÔMICO

Segundo Stebbins (1957), existem muitas evidências que indicam que os números cromossômicos básicos de todas as plantas floríferas são x=6, x=7 e x=8, e que todos os demais números de cromossomos apresentados pelos vegetais são derivações destes números ancestrais.

Dentre as leguminosas, 28,9% das espécies tem x=8. O percentual de espécies que apresentam x=8 cromossomos e múltiplos desse valor (16, 24, 32 e etc.) é de 42,17%, sendo este considerado então o número básico da família

Fabaceae (Senn,1938; Stebbins, 1957). No entanto, Wanscher (1934), citado por Senn (1938), sugeriu que o número básico de cromossomos das Leguminosas poderia ser x = 4.

1. 4. POLIPLOIDIA

Nas plantas, as principais formas de evolução ocorrem através de poliploidia, variação mendeliana e hibridação interespecífica. O interesse nessas formas de evolução vai além do valor histórico, porque elas coincidem com os métodos, usualmente, empregados pelos melhoristas de plantas (BANDEL, 1972).

Senn (1938), quando estudou 434 espécies incluídas em 71 gêneros das Leguminosas, verificou que 10 gêneros eram totalmente poliplóides, 42 gêneros apresentavam, exclusivamente, diploidia e 19 gêneros apresentavam maior freqüência de diploidia e menor frequência de poliploidia. Segundo este autor, 23% das leguminosas são poliplóides e 77% diplóides, sendo considerado baixo este percentual de poliplóides, em relação às outras famílias.

Segundo Senn (1938), os gêneros *Lupinus* (n=24), *Spartium* (n=24), *Laburnum* (n=24), *Ulex* (n=16), *Cytisus* (n=14), *Ononis* (n=16), *Swainsonia* (n=16), *Aeschynomene* (n=10) e *Glycine* (=20) são totalmente poliplóides. O autor acrescenta que há fortes indicações de que a duplicação do número de cromossomos foi originada de processos evolutivos.

Stebbins (1957) relatou a importância que a poliploidia teve na diferenciação de gêneros nas famílias Caesalpiniaceae e Mimosaceae. Em

ambas, o número de cromossomos da maioria dos gêneros está baseado em x=12, x=13 e x=14. Os gêneros *Cássia* e *Cercia*, da família Caesalpiniaceae, apresentam espécies baseados em x=6 e x=7 cromossomos. Estes dados levaram Stebbins (1957) a sugerir que os números de cromossomos dos gêneros atuais são derivações aneuplóides das formas ancestrais.

A aneuploidia desempenhou importante papel na evolução das leguminosas (SENN, 1938). Segundo o autor, a freqüência de espécies derivadas de x=6 e x=7 é bem maior do que as espécies com x=9 e x=10, sendo uma indicação de que a aneuploidia aconteceu mais freqüentemente por perda de cromossomos do que por adição de cromossomos ao genoma básico, no transcorrer do processo evolutivo.

Muitas citações da literatura relacionam a variação do número de cromossomos das espécies vegetais com o local onde elas se desenvolvem. Estes trabalhos procuram mostrar que as plantas com número diplóide de cromossomos têm uma distribuição geográfica mais restrita do que as plantas poliplóides. Isto leva a crer que as plantas poliplóides podem adaptar-se a uma variedade maior de habitats, enquanto que as diplóides são menos adaptáveis (BANDEL,1972).

Stebbins (1957), com base em uma ampla revisão bibliográfica, afirmou que não se pode tirar conclusões gerais a respeito da distribuição geográfica das plantas diplóides e poliplóides. Segundo o autor, em certos grupos de plantas parecem, realmente, existir relações entre grau de ploidia das espécies e sua distribuição geográfica.

Nas famílias Caesalpiniaceae e Mimosaceae são consideradas como diplóides as espécies com x=6, x=7 e x=8 cromossomos e como poliplóides as espécies com x=10 ou número maior de cromossomos. Na família Fabaceae, a classificação das espécies em diplóide e poliplóide seguiu um critério baseado na freqüência de números cromossômicos das espécies, onde o número básico mais freqüente que foi de x=8 (SENN,1938). Números básicos próximos de x=8, provavelmente, se originaram de aneuploidia em espécies com x=8, que também seriam diplóides.

Das espécies de leguminosas que já tiveram seus números cromossômicos determinados, verificou-se que na família Caesalpinaceae 17,23% são diplóides e 82,77% são poliplóides. Na família Mimosaceae 2,27% das espécies são diplóides e 97,73% são poliplóides e na família Fabaceae 70,35 % das espécies são diplóides e 29,65% são poliplóides. Juntando-se as três famílias, observou-se que 39,51% de espécies eram poliplóides e 60,49% diplóides. Nestes estudos não foi considerada a distribuição geográfica das espécies estudadas (BANDEL, 1972).

A alta freqüência de espécies poliplóides nas famílias Caesalpinaceae e Mimosaceae e a baixa freqüência de poliplóides nas Fabaceae são de difícil interpretação (BANDEL,1972).

Guerra (1988), Stace (1989) e Suzuki et al. (1989), concordam que a variação cromossômica pode surgir de diferentes maneiras, mas suas conseqüências evolutivas estão relacionadas à multiplicação do grupo haplóide (poliploidia) e ao aumento ou à diminuição do número cromossômico original (disploidia). Também podem ocorrer alterações estruturais, com variações no



tamanho cromossômico, na posição do centrômero, na quantidade de DNA, que pode ser perdido ou duplicado, na quantidade de heterocromatina, sendo essas alterações estruturais mais bem toleradas pelo organismo do que as numéricas (GUERRA, 1988).

1. 5. A IMPORTÂNCIA DA CITOGENÉTICA NO ESTUDO DA EVOLUÇÃO DE PLANTAS

Um grupo taxonômico de qualquer grau (espécie, gênero, tribo, etc.) é chamado táxon e as semelhanças verificadas nos membros dos táxons são, provavelmente, o resultado da existência de um ancestral evolutivo comum.

A evolução de várias famílias do reino vegetal tem sido estudada com base na variação numérica dos cromossomos de suas espécies, uma vez que características citológicas, tais como número e morfologia cromossômica, podem ser usadas em estudos filogenéticos e taxonômicos. O valor do número cromossômico como caráter taxonômico se dá, principalmente, pelo fato de ser uma característica comum em todos os indivíduos das mesmas espécies (BANDEL,1972).

Com o surgimento de novas técnicas para estudos cromossômicos tem sido possível avaliar, com refinamento de detalhes, as diferenças existentes entre as constituições dos cromossomos de plantas. Estes novos métodos têm permitido a quantificação e disposição de diferentes tipos de DNA, ao longo do cromossomo (JONES, 1978).

Dentre os parâmetros citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais conhecido para um grande número de taxa e, portanto, o mais utilizado

como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos. Segundo Greilhuber (1984), estudos citotaxonômicos necessitam, além de dados de número e morfologia cromossômica, informações sobre o conteúdo de DNA, bem como a distribuição e quantidade de heterocromatina avaliadas por meio de diferentes técnicas de bandamento, a diferenciação citoquímica da heterocromatina por fluorocromos, a localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) ativas transcricionalmente pelo método de impregnação com íons de prata, a localização do DNA satélite por hibridização *in situ* e sua relação com bandas de heterocromatina.

As técnicas de bandamento cromossômico evidenciam bandas que representam um tipo de organização do genoma dos eucariotos e refletem a diferenciação longitudinal existente nos cromossomos metafásicos.

As metodologias de bandamento foram, inicialmente, utilizadas em estudos de Citogenética Humana, onde se mostraram, particularmente, eficientes na detecção de alterações estruturais nos cromossomos tais como: deleções, duplicações e inversões, permitindo identificar, com precisão, qual a região do cromossomo envolvida. Em outras espécies, as técnicas de bandamento tem sido usadas para avaliar alterações cromossômicas que se estabeleceram no cariótipo, bem com identificar, em células híbridas, os cromossomos de cada espécie parental. Em estudos de evolução, o bandamento tem possibilitado uma melhor avaliação das transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas com cariótipos semelhantes.

Os diferentes métodos de bandamento cromossômico, têm possibilitado grande avanço na cariossistemática de plantas, em especial nas



Angiospermas. Estes métodos, por evidenciarem uma diferenciação longitudinal dos cromossomos, possibilitam uma identificação mais precisa dos mesmos, permitindo a análise das relações existentes entre os diferentes grupos de plantas (VOSA, 1985).

A técnica de coloração com nitrato de prata, permite a identificação das regiões organizadoras de nucléolo nas constrições secundárias dos cromossomos satelitados de plantas e animais. Esta técnica tem sido usada para detectar sítios de genes RNAr ativos, uma vez que NORs funcionalmente ativas durante a interfase que precedeu a mitose que se observa, podem ser visualizados (VERMA, 1995). Em eucariotos os genes ribossômicos, (18S;5,8S;28S) são organizados em seqüências repetidas em tandem, localizados em alguns poucos sítios cromossômicos. A técnica de hibridação *in situ* permite a identificação de todos os DNAr, além dos encontrados nas constrições secundárias de cromossomos satelitados por $AgNO_3$.

Um outro tipo de abordagem no estudo da heterocromatina de diferentes espécies de plantas cultivadas e selvagens têm consistido na técnica de coloração dos cromossomos por fluorocromos base-específicos. Esses fluorocromos revelam, de um modo geral, os subconjuntos de heterocromatina constitutiva ricos em A+T (quinacrina e DAPI) ou ricos em G+C (cromomicina A_3 e mitramicina).

A introdução de técnicas de bandamento em estudos de cromossomos de plantas, tem ajudado a elucidar vários problemas da estrutura dos cromossomos e mostrado ser uma importante ferramenta, na identificação de alterações da organização do material genético. Assim, essas técnicas são de

grande utilidade nos estudos de Taxonomia, além de auxiliar na caracterização de espécies e variedades, podendo contribuir para um melhor entendimento sobre a evolução destas espécies.

1. 6. ESTUDO CITOGENÉTICO EM LEGUMINOSAS

São encontrados na literatura vários exemplos de estudos bem sucedidos em citogenética e citotaxonomia vegetal. No Brasil, muitos estudos foram realizados com base na avaliação cromossômica para Leguminosae, (BANDEL,1974; COLEMAN & DE MENEZES, 1980; FORNI-MARTINS, 1984; BATTISTIN & VARGAS,1989; SENFF et al.,1992; OLIVEIRA & AGUIAR-PERECIN, 1999; KLANT & SCHIFINO-WITTMANN, 2000).

Pesquisas sobre o número de cromossomos nas famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae têm merecido a atenção de diversos pesquisadores. Fedorov (1969), em sua revisão bibliográfica sobre contagens de números de cromossomos em plantas cita, aproximadamente, 500 referências bibliográficas de pesquisas citogenéticas realizadas nestas famílias.

Mais recentemente, técnicas citogenéticas modernas estão sendo utilizadas para uma melhor avaliação dos cromossomos das famílias Caesalpinaceae, Mimosaceae e Fabaceae, nos permitindo um melhor entendimento do processo evolutivo ocorrido nessas famílias.

O padrão de distribuição de heterocromatina em cromossomos de plantas foi realizado para 105 espécies de angiospermas, pela metodologia de bandamento-C, bandamento com fluorocromos e FISH. Dentre estas espécies,

algumas leguminosas foram avaliadas e foi verificada uma distribuição, preferencial, da heterocromatina constitutiva nas regiões proximais dos cromossomos (GUERRA, 2000). Este padrão de distribuição ocorreu em *Arachis hypogaea* (CAI et al., 1987; FERNANDEZ & KRAPOVICKAS, 1994), *Medicago sativa* (MASOUD et al.,1991; CALDERINI et al., 1996), *Cicer arietinum* (GALASSO et al., 1996) e *Vigna sesquipedalis* (ZHENG et al.,1991). Em *Lathyrus aphaca* (UNAL et al.,1995) e *Vicia lútea* (RAMSAY, 1984), a distribuição da heterocromatina constitutiva ocorreu, preferencialmente, nas regiões terminais e intersticiais.

Considerando somente os cariótipos com heterocromatina constitutiva restrita a uma única região do cromossomo, em geral, as bandas-C, são ligeiramente, mais freqüentes na região proximal do que em outras regiões. Essa evidência foi observada para 33 de 105 espécies analisadas, por Guerra (2000), onde 23 delas apresentaram bandas proximais, embora o autor admita a possibilidade de haver, nestas contagens, algumas distorções. Ainda segundo o autor, a freqüência de bandas teloméricas pode ser superestimada devido à ocorrência de HC-RON nesta região, que nem sempre é identificada com esta técnica e pode ser, erroneamente, contada como banda-C comum. Por outro lado, a freqüência reduzida de blocos de heterocromatina constitutiva intersticial em cromossomos pequenos pode ser, parcialmente, devido a dificuldades técnicas em localizar estas bandas nos braços de cromossomos muito pequenos.

A distribuição de bandas-C parece depender, parcialmente, do tamanho do cromossomo. Bandas proximais, em geral, são mais comuns em cariótipos

com cromossomos pequenos, diminuindo essa freqüência com o aumento do tamanho do cromossomo.

Cariótipos com presença exclusiva de bandas proximais foram encontrados em 11 das 34 espécies com cromossomos pequenos, estudadas por Guerra (2000). O autor observou também a presença de bandas proximais em 12 espécies das 71 estudadas com cromossomos de tamanho médio e grande, sugerindo que esta região possa ser, freqüentemente, mais susceptível ao aparecimento ou à conservação de bandas-C.

As espécies *Latyrus sativus* (COX et al., 1993), *Phaseolus coccineus* (NAGL,1991), *Pisum sativum* (RAWLINS et al,1991), *Vicia faba* (SCHUBERT,1992), *Vicia narbonensis* (FUCHS, et al., 1995), *Vicia sativa* (COX et al., 1993; FUCHS et al.,1995) e *Vigna radiata* (COX et al.,1993), pertencentes à família Fabaceae, foram investigadas pela técnica de FISH para a localização da seqüência telomérica $(TTTAGGG)_n$ de *Arabidopsis thaliana*. Foram também encontradas marcações destas seqüências nas extremidades dos braços dos cromossomos metafásicos e politênicos de *Phaseolus coccineus* (NAGL,1991). Porém, nos estudos realizados por SCHUBERT (1992) em *Vicia faba*, foi observado um locus intersticial regular de seqüência telomérica no braço curto do cromossomo II e uma marcação polimórfica na região centromérica do cromossomo I, metacêntrico e satelitado.

No Brasil, alguns gêneros de Leguminosas vêm sendo, preferencialmente, estudados por meio de diferentes técnicas de bandamento e hibridação, por diferentes grupos de citogeneticistas vegetais. Dentre os pesquisadores, Senff et al. (1992) realizaram estudos com *Vigna*, Forni-Martins

& Guerra (1999), com *Sesbania*, Klant & Schifino-Wittman (2000), com *Lathyrus* e Mondin & Aguiar-Perecin (2003) com *Crotalaria*.

Os estudos realizados em diferentes grupos de leguminosas, são de suma importância, pois nos fornecem dados que possibilitam um melhor entendimento da variação cromossômica e evolução ocorrida no grupo.

Nas últimas décadas, um melhor entendimento da importância da variação cromossômica no processo de evolução de plantas tem sido possível, graças a estas novas técnicas de hibridação, pintura cromossômica, mapeamento genético, técnicas avançadas de PCR, análise filogenética e citometria de fluxo (HUSBAND, 2004).

Um outro aspecto do sistema genético de plantas que tem recebido pouca atenção refere-se aos estudos de mudanças cromossômicas e de tamanho do genoma. As plantas exibem uma considerável variação destas características, contudo estas funções na especiação não têm sido, explicitamente, consideradas. O centro desta controvérsia se dá com base na "*Junk DNA hypothesis*", isto é, se é o aumento do tamanho do genoma que tem valor adaptativo ou se é, simplesmente, um acúmulo acidental de DNA não codificante.

O uso de citometria de fluxo e micro-densitometria tem permitido uma estimativa mais rápida e precisa do tamanho do genoma, pois permite fazer uma melhor avaliação em relação as hipóteses evolucionárias. Essas pesquisas têm revelado a existência de muita variação dentre, bem como entre as espécies (HUSBAND, 2004).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Assim, o uso de diferentes técnicas citogenéticas que são, comumente, usadas na avaliação dos cromossomos das espécies vegetais, tem fornecido informações importantes para a melhor compreensão das variações cromossômicas ocorridas nas espécies, bem como a importância destas variações no processo evolutivo de plantas.

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar, citogeneticamente, alguns representantes das famílias CAESALPINACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE ocorrentes em diferentes áreas do cerrado de Três Lagoas (MS), pela técnica de coloração convencional, de bandamento com fluorocromos base-específicos e por hibridação *in situ* com fluorocromos para:

- Determinar os números cromossômicos das espécies das famílias acima citadas;
- Determinar o padrão de distribuição de bandas CMA/DAPI;
- Localizar os sítios DNAr 45S.

Capítulo 1

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE DOZE ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS DE ÁREAS DE CERRADO DA REGIÃO DE TRÊS LAGOAS –MS.

Autores: Ferreira, M.A.M.M.; Marin-Morales, M.A.

RESUMO

As famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae genericamente conhecidas como leguminosas, embora caracterize um grupo vegetal muito importante, pela ampla diversidade, devido ao grande número de espécies que possuem, apresentam poucos estudos envolvendo a caracterização cromossômica de suas espécies. Neste estudo foram realizadas avaliação citogenéticas em 12 espécies dessas famílias, onde foram investigados os números e morfologia de seus cromossomos. As espécies avaliadas apresentaram uma variação cromossômica de 2n=16 em (*Dipterix alata*) a 2n=28 (*Stryphnodendon adstringens*). Todas as espécies avaliadas apresentaram cromossomos pequenos e cariótipos simétricos.

Palavras chave – Cerrado, citogenética, Leguminosae e número cromossômico.

1. INTRODUÇÃO

O cerrado brasileiro é constituído por uma vegetação bastante peculiar, podendo ser caracterizado em ordem crescente de biomassa, como campo sujo, campo cerrado, cerrado e cerradão, sendo as três primeiras formações campestres e a última formação florestal (COUTINHO, 1990). No que se refere à distribuição, o cerrado ocorre, principalmente, nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Roraima, Minas Gerais e Piauí, e com pequenas áreas descontínuas nos estados do Paraná e São Paulo, bem como nas regiões Norte e Nordeste (CASTRO et al., 1999). Dentre as famílias encontradas neste ecossistema, as leguminosas destacam-se, não só pelo elevado número de representantes, bem como pela sua importância sócio-econômica, sendo constituídas por 690 gêneros e aproximadamente 17.600 espécies (HUTCHISON, 1964).

Muitos taxonomistas consideram a família Leguminosae subdividida em três sub-famílias: Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Outros, porém, consideram estes três grupos citados como famílias, por serem, botanicamente, distintos.

Apesar de pertencerem a um grupo natural bem delimitado e característico, as espécies apresentam uma grande variação entre si, além de acentuada variação de hábito, o que as tornam um excelente material para estudos dos processos evolutivos (BANDEL, 1972). Para uma melhor compreensão das espécies e do posicionamento taxonômico que estes vegetais ocupam, tem sido realizada uma série de estudos, que acabaram por investigar os taxons sob diversos enfoques. Assim, estudos citogenéticos,

associados a novas técnicas que permitem avaliar, as diferenças existentes entre as constituições dos cromossomos de plantas, são importantes por possibilitarem uma identificação mais precisa dos mesmos, permitindo a análise das relações existentes entre os diferentes grupos de plantas (VOSA, 1985).

O presente trabalho fornece dados sobre o número de cromossomos de 12 espécies de leguminosas encontradas no cerrado de Três Lagoas, MS. Os dados aqui apresentados podem contribuir na definição das unidades taxonômicas do grupo de plantas estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as espécies utilizadas neste estudo foram coletadas em regiões de Cerrado no estado de Mato Grosso do Sul, próximas à cidade de Três Lagoas, MS, tais como: Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú e Rodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS (Tabela1). As Exsicatas das espécies analisadas encontram-se depositadas no herbário do Departamento de Ciências Naturais do Câmpus de Três Lagoas, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína a 300ppm por 2 horas e 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético glacial) por 12 horas, também à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, mantidas em "freezer". Para a preparação das lâminas, os meristemas radiculares sofreram

digestão enzimática em solução de 2% de celulase e 20 % de pectinase a 37ºC, por 30 a 60 minutos, dependendo da espécie. Após esse procedimento, os meristemas foram esmagados em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas coradas com uma solução de Giemsa a 2% ou pela metodologia de Feulgen (análise convencional de algumas espécies). As lâminas permanentes foram montadas em Entellan. Contagens cromossômicas foram realizadas em, no mínimo, 10 células por espécie. Quando estas apresentaram-se em boas condições de espalhamento cromossômico ou favoráveis à análise de sua morfologia, foram então fotodocumentadas em filme Imagelink Kodak e copiadas em papel Kodabromide F3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as espécies de Caesalpinaceae analisadas, foram encontrados 2n=24 para *Copaifera langsdorffii, Hymenaea stigonocarpa* e 2n=28 *Dimorphandra mollis* (Figs 1a, 1c e 1b, respectivamente), que apresentaram cromossomos de tamanho médio, cariótipo simétrico, constituído por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Em alguns cromossomos foi possível observar a presença de satélites no braço curto. Em *Copaifera langsdorffii* foi possível observar a presença de, pelos menos, 4 pares de cromossomos com satélites, sendo 2 deles nos maiores metacêntricos do cariótipo e um no maior submetacêntrico e outro no par acrocêntrico. Em *Hymenaea stigonocarpa*, foi possível observar a presença de satélite em, pelo menos, um par de cromossomo.

Tabela 1. Espécies de leguminosas analisadas com os respectivos números de coleção, local de coleta e número cromossômico encontrado.

Família/Espécies	Número de coleção	Local de coleta	2n
Caesalpiniaceae			
Copaifera langsdorffii Desf.	MAC101	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	24
Dimophandra mollis Benth.	MAC102	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	28
Hymenaea stigonocarpa Mart.	MAC103	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	24
Fabaceae			
Acosmium dasycarpum Yak.	MAF101	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	18
Acosmium subelegans Yak.	MAF102	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	18
Dipteryx alata Vog.	MAF104	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	16
Diptychandra aurantiaca (Mart.)	MAF105	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	22
Dalbergia miscolobium (Vog.)	MAF107	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	20
Mimosaceae			
Albizia polychephala Benth.	MAM102	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26
Anadenanthera falcata (Benth.) Speg	MAM103	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26
Plathymenia reticulata Benth	MAM105	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26
Stryphnodendon adstringens (Mart.) Coville	MAM104	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26



Ao avaliarmos o núcleo interfásico de todas as espécies de Caesalpinaceae, notamos que estes foram do tipo semi-reticulado, pela quantidade de cromatina difusa que portavam. Este mesmo tipo de núcleo interfásico foi encontrado para 10 espécies de Caesalpinaceae do Pará descritas por SOUZA & BENKO-ISEPON (2004).

O número de cromossomos observados para as espécies de Caesalpinaceae são concordantes com outras citações prévias encontradas na literatura para as espécies *Dimorphandra mollis* e *Hymenaea stigonocarpa* (BANDELI, 1972). Os valores aqui registrados para *Copaifera langsdorffii* estão de acordo com as citações de Coleman (1982), para *Copaifera martii.*

Os satélites observados para as espécies de Caesalpiniaceae analisadas, na maioria das vezes, ocorreram no braço curto dos cromossomos submetacêntricos (*Copaifera langsdorffii* e *Hymenaea stigocarpa*). Em Fabaceae, também foram observados satélites no braço longo dos cromossomos. Estes satélites têm sido reportados para algumas espécies de *Lathyrus* (BATTISTIN et al. 1999; KLANT & SCHIFINO-WITTMAN, 2000), sugerindo que sua posição pode variar entre as espécies do gênero. Foi encontrada uma condensação proximal da cromatina para algumas espécies estudadas (*Acosmium subelegans, Dipteryx alata, Albizia polycephala* e *Plathymenia reticulata*) (Figs.1e e 1f, 1g, 2j e 2l, e 2m respectivamente). As demais espécies apresentaram condensação mais homogênea.

As espécies de Fabaceae avaliadas neste estudo apresentaram números cromossômicos de 2n=18 (*Acosmium dasycarpum* e *Acosmium subelegans*) (Figs. 1d e 1e e 1f), 2n=20 (*Dalbergia miscolobium*) (Fig.2i),

2n=16 *Dipteryx alata* (Fig.1g) e 2n=22 (*Diptychandra aurantiaca)* (Fig.1h). Todas as espécies apresentaram cromossomos pequenos e cariótipos simétricos, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, exceto *Dalbergia miscolobium*, que apresentou cariótipo, levemente, assimétrico, onde dois pares de cromossomos são, ligeiramente, maiores em relação aos outros oito pares. O núcleo interfásico das espécies de Mimosaceae em estudo são do tipo semi-reticulado, com diferenças no tamanho, no número, na forma e na distribuição de cromocêntro (Figs.2k, 2l, 2m e 2n). O núcleo interfásico de *Diptychandra aurantiaca* é do tipo arreticulado, com pouca cromatina difusa presente.

O número de cromossomos 2n=18, encontrado para a espécie *A. subelegans*, está de acordo com dados citados na literatura, descritos a partir de análise meiótica realizada por Forni-Martins et al. 1995. Nenhuma citação foi encontrada para *A.dasycarpum*, sendo os nossos dados inéditos para a espécie. Número cromossômico de 2n=16 e 2n=20, respectivamente para *D. alata* e *D. Miscolobium*, concordam com dados prévios citados por Bandel (1972), em seu estudo sobre número cromossômico de leguminosas.

Não foram encontradas na literatura descrições sobre o número de cromossomos para espécies do gênero *Diptychandra*. Assim, os dados aqui descritos para a espécie *D. aurantiaca* (2n=22) são também inéditos.

Todas as espécies de Mimosaceae, avaliadas citologicamente neste estudo, apresentaram números cromossômicos igual a 2n=26 (*Albizia polycephala*, *Anadenanthera falcata*, *Plathymenia reticulata*, e *Stryphnodendon adstringens*) Figs.(2j e 2k, 2l, 2m e 2n). Os cariótipos foram simétricos, sendo

constituídos por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e não sendo observado diferenças significativas de tamanho entre os cromossomos do conjunto. Os núcleos interfásicos foram caracterizados como do tipo arreticulado (2i) e semireticulado (2k,2l,2m e 2n), mostrando diferença quanto ao tamanho, forma e distribuição dos cromocêntros. Os dados referentes ao número cromossômico observado para *Albizia polycephala* (2n=26) corroboram com as descrições de Huang et al. (1989), citadas para o gênero. O número cromossômico de *Anadenanthera falcata* (2n=26), descrito neste trabalho está de acordo com os dados citados por Gibbs et al. (1989), para outras espécies deste mesmo gênero (*Anadenanthera columbrina*). Devido aos cromossomos das espécies *Albizia polycephala, Plathymenia reticulata* e *Stryphnodendon adstringens* serem muito pequenos, foi difícil uma caracterização mais precisa da morfologia cromossômica destes materiais.

Segundo Stebbins (1957), existem muitas evidências que indicam que os números básicos todas as plantas floríferas são n=6, n=7 e n=8, e que todos os demais números encontrados nos vegetais são derivações destes números ancestrais. Segundo Senn (1938), 28,9% das espécies de leguminosas têm n=8 cromossomos. O percentual de espécie que apresentam n=8 e seus múltiplos (16, 24, 32 e etc.) é de 42,17%, segundo o mesmo autor, o que o levou a afirmar que o número básico de cromossomos na família Fabaceae é de n=8. Stebbins (1957) também sugeriu este número básico (n=8) para as espécies de Fabaceae. Porém, Wanscher (1934), citado por Senn (1938), aventou a possibilidade do número básico das Leguminosas ser de x=4.

Nas famílias Caesalpiniaceae e Mimosaceae, consideraram-se como diplóides as espécies com n=6, n=7 e n=8 cromossomos e como poliplóides as espécies com n=10 ou número maior de cromossomos. Na família Fabaceae, a classificação das espécies em diplóide e poliplóide seguiu o critério de utilização do número de cromossomos n=8, por ser este o mais freqüente no grupo (SENN, 1938). Números cromossômicos próximos de n=8, provavelmente, se originaram por aneuploidia, a partir das espécies com n=8, que também seriam diplóides.

Dentre os estudos citogenéticos realizados em Leguminosas foi verificada que na família Caesalpinaceae, 17,23% das espécies são diplóides e 82,77% são poliplóides. Na família Mimosaceae, 2,27% das espécies são diplóides e 97,73% são poliplóides e, na família Fabaceae, 70,35% das espécies são diplóides e 29,65% são poliplóides. Juntando-se as três famílias, observou-se que 39,51% de espécies eram poliplóides e 60,49% diplóides. Neste caso, não foram consideradas as distribuições geográficas das espécies estudadas (BANDEL, 1972).

Desta forma, as espécies de Fabaceae avaliadas, exceto *Dipterix alata* que tem 2n=16, são consideradas poliplóides (*Acosmium subelegans* 2n=18, *Acosmium dasycarpum* 2n=18, *Dalbergia miscolobium* 2n=20, *Diptychandra aurantiaca* 2n=22) segundo Senn (1938), pois, provavelmente, teriam se originado por aneuploidia, a partir de uma espécie ancestral com n=8.

De acordo com Senn (1938), outras espécies de Mimosaceae (*Anadenanthera falcata* 2n=26, *Albizia polycephala* 2n=26, *Plathymenia reticulata*2n=26 e *Stryphnodendon adstringens* 2n=26) e Caesalpinaceae

(*Copaifera langsdorffii 2n=24, Dimorphandra mollis 2n=28* e *Hymenaea stigocarpa* 2n=24) apresentaram valores de n igual a 12, 13 e 14, sendo, portanto, consideradas espécies poliplóides.

Considerando a tendência clássica de evolução vegetal, a partir de simetria para assimetria, seguido de aumento no tamanho do cromossomo de cariótipos de mesmo nível de ploidia, Stebbins (1971) reconheceu ser as Caesalpiniaceae um grupo menos derivado dentro das Leguminosas, porque suas espécies apresentam n=2, 3, 8, 12 e 13 e tendem a possuir cromossomos pequenos com cariótipos, relativamente, simétricos, como foi possível ser observado em nossos estudos.

O predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com cariótipos, relativamente, simétricos também foi encontrado em um estudo realizado por Souza & Benko-Iseppon (2004) com leguminosas coletadas no Pará e Amazônia, de Caesalpiniaceae (gêneros *Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Cássia*, *Chamaecrista* e *Senna*) e Fabaceae (gêneros *Bowdichia*, *Centrosema* e *Dicloea*).

Pesquisas sobre o número de cromossomos nas famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae têm merecido a atenção de diversos pesquisadores. O uso de diferentes técnicas citogenéticas na avaliação dos cromossomos tem fornecido importantes informações para a melhor compreensão das variações cromossômicas ocorridas nas espécies, o que permite um melhor entendimento do processo evolutivo ocorrido no grupo.

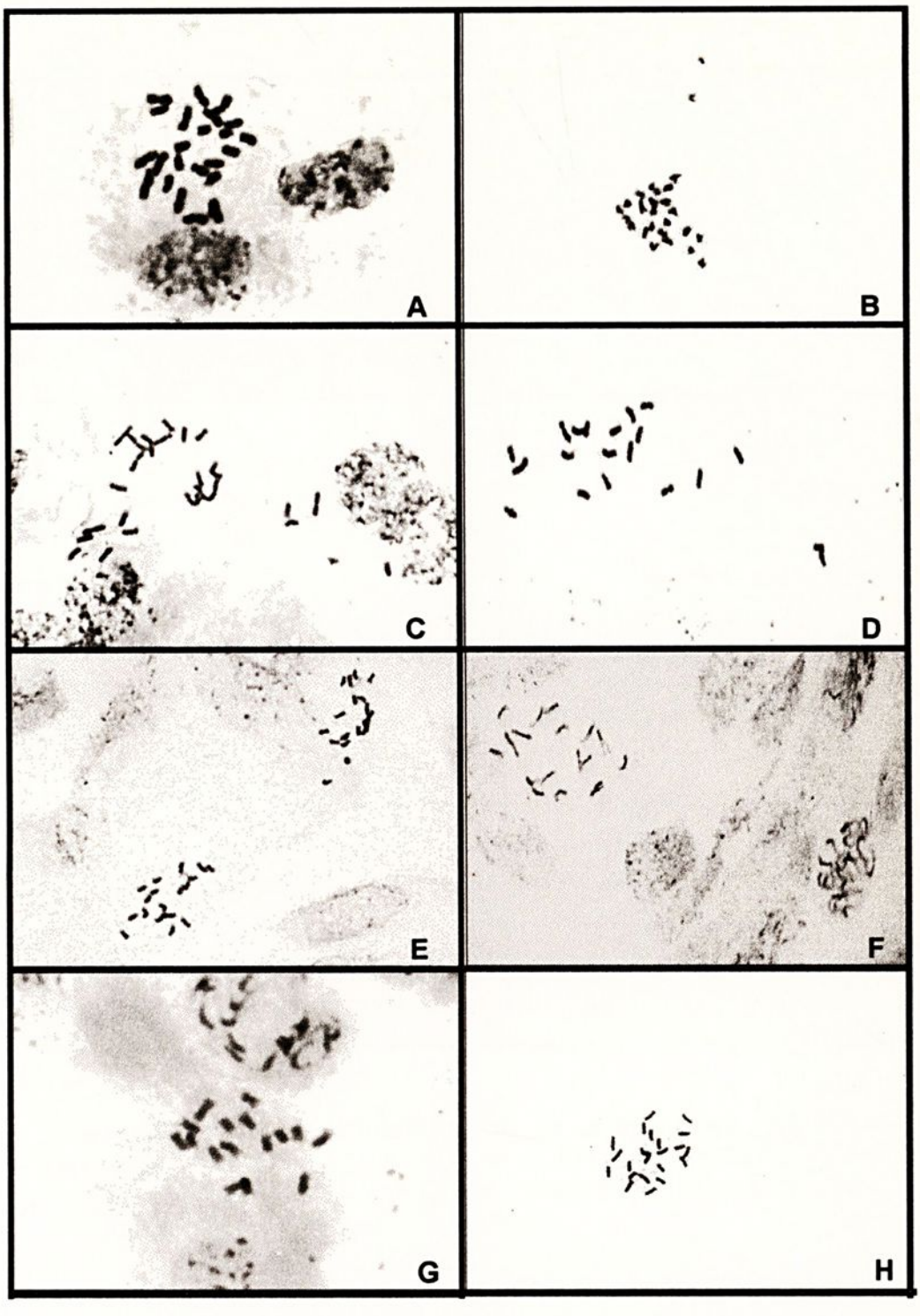


FIGURA 1: Número cromossômico de espécies de leguminosas. **A**. *Copaifera langsdorffii* - 2n= 24; **B**. *Dimorphandra mollis* - 2n= 28; **C**. *Hymenaea stignocarpa* - 2n= 24; **D**. *Acosmium dasycarpum* - 2n= 18; **E e F** . *Acosmium subelegans* - 2n= 18; **G**. *Dipterix alata* - 2n= 16; **H**. *Diptychandra aurantiaca* - *2n=22*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

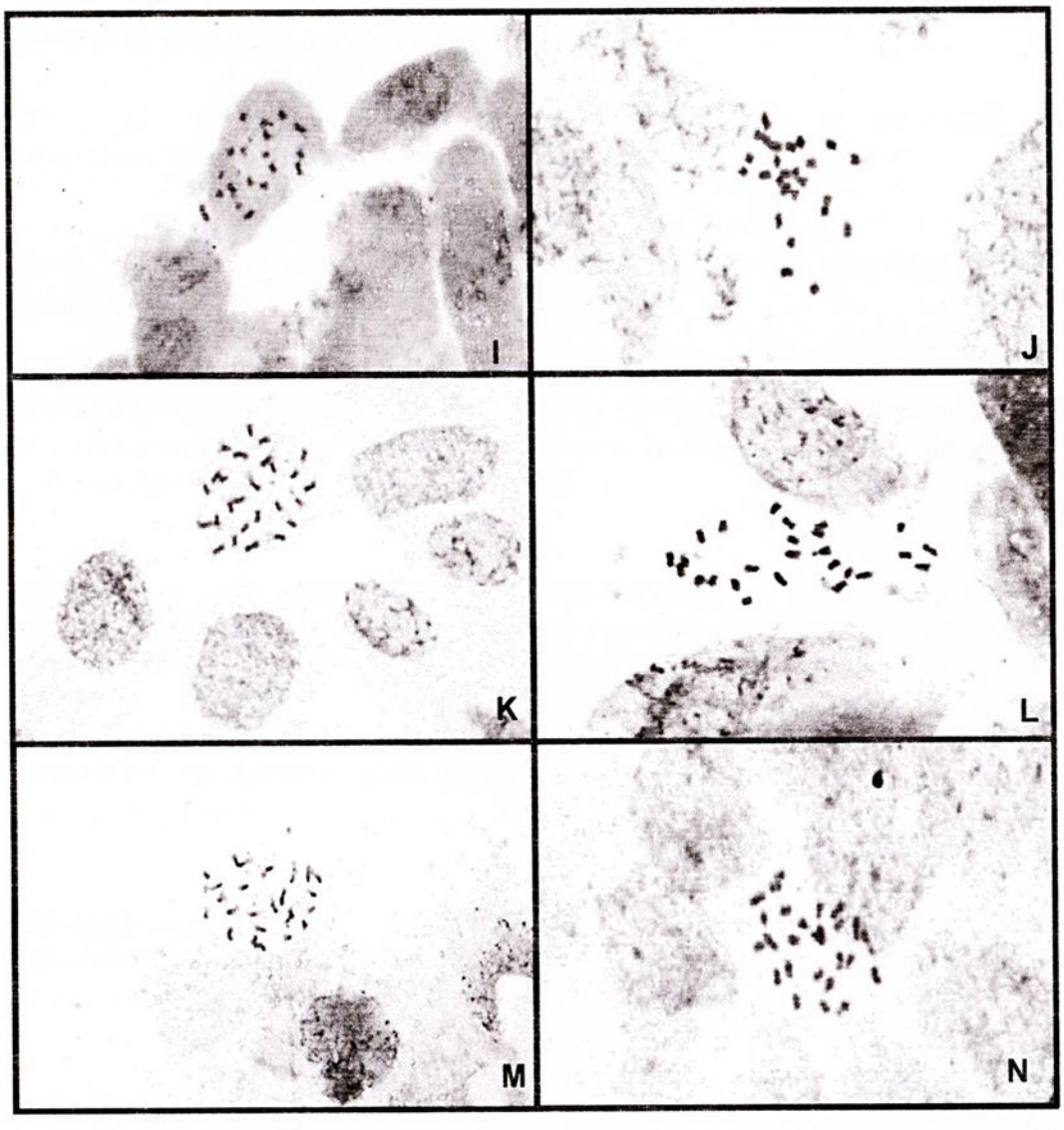


FIGURA 2: Número cromossômico de espécies de leguminosas. **I.** *Dalbergia miscolobium*- 2n= 20; **J** e **K.** *Albizia polychephala* - 2n=26; **L.** *Anadenanthera falcata* - 2n= 26; **M.** *Plathymenia reticulata* - 2n= 26; **N.** *Stryphnodendon adstringens* - 2n= 28.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEL, G. Variação numérica de cromossomos e evolução nas Leguminosas. Tese de Doutorado, Piracicaba, USP, 138p. 1972.

BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the *Leguminosae*. **Caryologia,** Firenze, v. 27, p. 17-32. 1974.

BATTISTIN A.; BIONDO E.; COELHO L.G.M. Chromosomal characterization of three native and cultivated species of *Latyrus* L. in Southern Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto v.22, p.557-563. 1999.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F.R.; TAMASHIRO, J.Y.; SHEPHERD, G.J. How rich is the flora of Brazilian cerrados? **Annals of the Missouri Botanical Garden,** Saint Louis, v. 86, p.192-224. 1999.

COUTINHO, L. M. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.68, p. 22-30. 1990.

FORNI-MARTINS, E. R. **Estudos Citotaxonômicos no complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* (Leguminosae Papilionoideae)**. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1984.

GIBBS, P. E., INGRAN, R. Chromosome numbers of some Brazilians flowering plants. **Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh.,** [S.l], v.40, p.339-447. 1982.

HUANG, S. F. Z, ZHAO, F., CHEN, Y., CHEN, X. Chromosome counts on one hundred species an intraspecifica taxa. **Acta. Bot. Austro. Sin**.[S.l], v. 5, p. 161-176. 1989.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants**. Dicotyledones, vol.I. Clarendon Press, Oxford. 516 pp. 1964.

KLANT, A.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 463-467. 2000.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SENN, H. A. Chromosome numbers relationship in the Leguminosae. **Bibliografia Genética**, [S.l], v.12,p.175-536. 1938.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Bot. Jour. Linn. Soc.**, Londres, v.144, p.181-191, 2004.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia University Press. New York. 643p. 1957.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants.** London: Edward Arnold Publishers Ltd. 1971.

VOSA, C. G. **Plant chromosome banding and cytotaxonomy**. In: Aguiar-Perecin, M.L.R.; Martins, P.S.; Bandel, G. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. p:17-25. 1985

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE NA DISTRIBUIÇAO DE BANDAS CMA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS NATIVAS DO CERRADO.

Autores: Ferreira, M.A.M.M; Vanzela, A.L.L.; Marin-Morales, M.A.

Resumo

O uso de técnicas que permitem uma melhor caracterização dos cromossomos pela diferenciação linear dos mesmos vem sendo usada, cada vez mais, nos estudos citogenéticos de diferentes espécies. Dentre estas técnicas, o bandamento cromossômico com fluorocromos base espécificos, tem sido muito utilizadoS pela riqueza de informação que oferecem. Neste trabalho foram avaliados seis espécies de leguminosas nativas do cerrado do Centro Oeste brasileiro e observamos a ocorrência de bandas $CMA^{+}/DAPI^{-}$ para todas as espécies analisadas, o que evidencia a presença de regiões heterocromáticas ricas em GC.

Palavras chave – bandamento cromossômico, Fabaceae, Caesalpinaceae, Mimosaceae e CMA_3/DAPI.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas são plantas que apresentam uma grande diversidade morfológica, ampla distribuição geográfica, grande variação de número e morfologia cromossômica, além de ser um dos mais numerosos grupos do reino vegetal. Por essas caracteristicas, esse grupo de plantas constitui um interessante material para os estudos de filogenia e evolução (BANDEL, 1972).

As espécies das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae, comumente conhecidas como Leguminosas, são consideradas de grande importância para o cerrado brasileiro por apresentarem grande número de espécies endêmicas nesta formação vegetal (cerca de 17.600).

Dentre os parâmetros citogenéticos, o número de cromossomos é o mais conhecido para um grande número de taxa e, portanto, o mais utilizado nos estudos taxonômicos e evolutivos. Segundo GREILHUBER (1984), estudos citotaxonômicos necessitam, além de dados de número e morfologia cromossômica, informações sobre o conteúdo de DNA, a distribuição e a quantidade de heterocromatina a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ativas a identificação do DNA satélite por hibridização *in situ* e a sua relação com as bandas de heterocromatina, bem como a localização de genes ribossomais.

Estudos utilizando diferentes técnicas de bandamento cromossômico são aplicados em espécies de vegetais para subsidiar o posicionamento taxonômico de grupos relacionados ou não. Novas técnicas para estudos cromossômicos têm permitido avaliar, com refinamento de detalhes, as diferenças na constituição dos cromossomos de plantas, baseados na

disposição de diferentes tipos de DNA, ao longo do cromossomo (JONES, 1978; GUERRA, 2000).

As técnicas de bandamento cromossômico evidenciam bandas que representam um tipo de organização do genoma dos eucariotos e refletem na diferenciação longitudinal existente nos cromossomos metafásicos. Estas técnicas de bandamento têm sido usadas para avaliar alterações cromossômicas que se estabeleceram no cariótipo, bem com para identificar, em células híbridas, os cromossomos de cada espécie parental. Em estudos de evolução, o bandamento cromossômico tem possibilitado uma melhor avaliação das transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas com cariótipos semelhantes.

A introdução de técnicas de bandamento em estudos de cromossomos de plantas, tem ajudado a elucidar vários problemas da estrutura dos cromossomos e mostrado ser uma importante ferramenta na identificação de alterações da organização do material genético. Assim, essas técnicas são de grande utilidade nos estudos de taxonomia, além de auxiliar na caracterização de espécies e variedades, podendo contribuir para um melhor entendimento sobre a evolução das espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas seis espécies das famílas Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae coletadas em regiões do cerrado de Três Lagoas, MS. Exsicatas das espécies analisadas encontram-se depositadas no herbário do

Departamento de Ciências Naturais do Câmpus de Três Lagoas, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Tabela1).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de meristemas radiculares, pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína a 20 mM, por duas horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético), por 12 horas à temperatura ambiente e, posteriormente, mantidas no "freezer". Para a preparação das lâminas, os meristemas foram digeridos em uma solução contendo 2% de celulase e 20 % de pectinase a 37ºC, por 30 a 60 minutos, dependendo da espécie e então esmagadas em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas, após secas, foram guardadas por três dias para envelhecimento, e submetidas à técnica de bandamento-C, antes de ser aplicada a técnica de dupla-coloração com fluorocromos CMA_3/DAPI (SCHWEIZER, 1976).

Para o bandamento com fluorocromos, foi colocado sobre o material uma gota de Cromomicina A_3 (CMA_3 0,5 mg/ml, em tampão McIlvaine pH7,0 com 2,5 mM de $Mgcl_2$) sobre as lâminas e cobertas com uma lamínula de plástico. As lâminas foram guardadas em câmara úmida, no escuro, por 60 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram retiradas com um jato de água destilada e as lâminas secas com uma bomba de ar. Em seguida foi adicionado ao material uma gota de DAPI (2μg/ml) e também cobertas com uma lamínula de plástico. As lâminas foram guardadas no escuro por 30 minutos. Após a lavagem em água as lâminas foram secas e montadas em meio de montagem glicerol/McIlvaine (contendo $MgCl_2$) e cobertas com uma lamínula de vidro. O

excesso de meio foi retirado, pressionando-se a lâmina entre uma folha de papel de filtro.

As lâminas foram guardadas por, pelo menos, três dias antes de serem analisas ao microscópio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fluorocromos base específicos, CMA_3/DAPI foram usados para a avaliação de seis espécies das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Todas as espécies apresentaram bandas CMA_3^+/$DAPI^-$, com variação no número, tamanho e posição dos segmentos heterocromáticos.

Grandes blocos CMA_3^+/$DAPI^-$ foram observados em *Copaifera langsdorffii*, onde um dos pares apresentou bandas que ocupavam, praticamente, 50% dos braços cromossômicos. A distribuição desses blocos ocorreu, preferencialmente, nas regiões terminais dos braços curtos, onde muitas delas coincidiram com as constrições secundárias, como pode ser evidenciado nas figuras (1c e 1d) Também foi observada a presença de grandes blocos CMA_3^+/$DAPI^-$ em ambos os braços de um dos pares cromossômicos e outras pequenas bandas intersticiais em outros pares metacêntricos.

Em *Hymenaea stigonocarpa*, dois blocos CMA_3^+/$DAPI^-$ pequenos foram observados na região proximal de um dos pares de cromossomos acrocêntricos (Fig.1e,1fe1g). Duas bandas intersticiais pequenas também foram evidenciadas em outro par cromossômico dessa espécie.

Em *Anadenanthera falcata* (2n=26), observamos quatro blocos terminais do braço curto de um dos pares de cromossomos e as outras duas bandas na região intersticial, também no braço curto de outro par (Fig 1h, 1i, 1j). Já em *Albizia polychephala*, outra espécie da família Mimosaceae, foram encontrados apenas dois blocos pequenos $CMA_3^+/DAPI^-$ na região terminal do braço curto de um dos pares submetacêntrico. Estas duas pequenas marcações também foram vizualizadas nos núcleos interfásicos (2k, 2l)

Na espécie *Diptychandra aurantiaca* (Fabaceae), foram observados 10 blocos de $CMA_3^+/DAPI^-$, sendo 4 deles de tamanho grande e bem evidentes e 6 menores, com sinal fluorescente mais reduzido (Fig.2m, 2n, 20, 2p e 2q). Esses blocos menores distribuíram-se, preferencialmente, no braço curto dos cromossomos, precisamente na região terminal do par acrocêntrico. Os demais blocos foram registrados para posições intersticiais dos braços cromossômicos. *Dalbergia miscolobium,* apresentou 8 blocos $CMA_3^+/DAPI^-$, distribuídos nas regiões terminais e intersticiais dos braços cromossômicos (Fig.2r,2s,2t).

Diante dos resultados obtidos pelo bandamento com fluorocromos base-específicos, podemos afirmar que as espécies estudadas apresentam cromatina rica em ligações GC, havendo variação, apenas, quanto ao número e distribuição desses blocos nos braços cromossômicos.

A aplicação de técnica de bandamento, é reconhecida como uma metodologia para evidenciar diferentes tipos de heterocromatina constitutiva em plantas (VOSA, 1970, 1976 & SCHWEIZER, 1976). Os fluorocromos Quinacrina(Q), Hoescht 33258 (H) e 4-6 diamino-2- phenylindole (DAPI) coram, preferencialmente, heterocromatina ricas em AT, enquanto que a Mitramicina

(MM) e Cromomicina A (CMA_3) coram heterocromatina, preferencialmente, ricas em GC.

A análise das seis espécies das famílias Caesalpinaceae (*Copaifera langsdorffi* e *Hymenaea stigonocarpa*), Fabaceae (*Dipitychandra aurantiaca* e *Dalbergia miscolobium*) Mimosaceae (*Anadenanthera falcata Albizia polychephala*), submetidas ao bandamento por fluorocromos CMA_3 e DAPI, revelaram grande quantidade de heterocromatina ricas em GC (CMA^+), distribuídas nas regiões terminais e intersticiais dos cromossomos. Não foi identificada nenhuma espécie com heterocromatina constitutiva rica em ligações AT. Foi observada variação, apenas, para o número e a posição das bandas $CMA_3^+/DAPI^-$, entre as espécies aqui estudadas.

Os poucos trabalhos que fazem referência ao uso desta técnica nestas famílias mostraram que há uma predominância de heterocromatina ricas em GC, pois houve uma marcação positiva, quando se utilizou o corante fluorescente CMA_3. Poucas espécies apresentam regiões heterocromáticas ricas em AT, reveladas pelo DAPI, sendo o padrão de bandas $CMA_3^+/DAPI^-$ o mais freqüente. O padrão $CMA_3^+/DAPI^n$ também é citado para o grupo, como encontrado para a espécie *Dicloea virgata* (SOUZA & BENKO-ISEPONN, 2004), sendo este padrão de bandas presente evidente para todos os cromossomos desta espécie. Em algumas Fabaceae, como *Vicia faba* e *Cicer arietinum*, foram encontradas regiões ricas em AT, com sequências CMA_3^+ restritas às regiões organizadoras de nucléolo (Galasso et al., 1996; Fuchs et al.,1998; Gortner et al., 1998).

Souza & Benko-Iseponn (2004) usaram fluorocromos para avaliar espécies das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae do Pará e da região Amazônica. Neste estudo, os autores observaram bandas $CMA^{+}/DAPI^{-}$ discretas, dispostas nas regiões terminais dos cromossomos e poucas espécies com bandas $CMA_3^{-}/DAPI^{+}$.

Entre as espécies avaliadas pela metodologia de bandamento por fluorocromos, *Copaifera langsdorffi* (2n=24) apresentou um padrão de bandas CMA_3 muito interessante, com grandes bandas distribuídas em quase todos cromossomos, merecendo uma caracterização melhor, que pode ser obtida pela aplicação de outras técnicas de citogenética, como a de molecular por hibridização *in situ*.

Tabela 1. Espécies de leguminosas submetidas a bandamento com fluorocromos base específicos CMA_3/DAPI com os respectivos números de coleção, local de coleta e número cromossômico encontrado.

Família/Espécies	Número de coleção	Local de coleta	2n
Caesalpiniaceae			
Copaífera langsdorffii Desf.	MAC101	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	24
Hymenaea stigonocarpa Mart.	MAC103	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	24
Fabaceae			
Diptychandra aurantiaca (Mart.)	MAF105	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	22
Dalbergia miscolobium (Vog.)	MAF107	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	20
Mimosaceae			
Albizia polychephala Benth.	MAM102	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26
Anadenanthera falcata (Benth.) Speg	MAM103	Área de Proteção Ambiental da CESP, Alto Sucuriú eRodovia Estadual Três Lagoas–Selvíria-MS	26

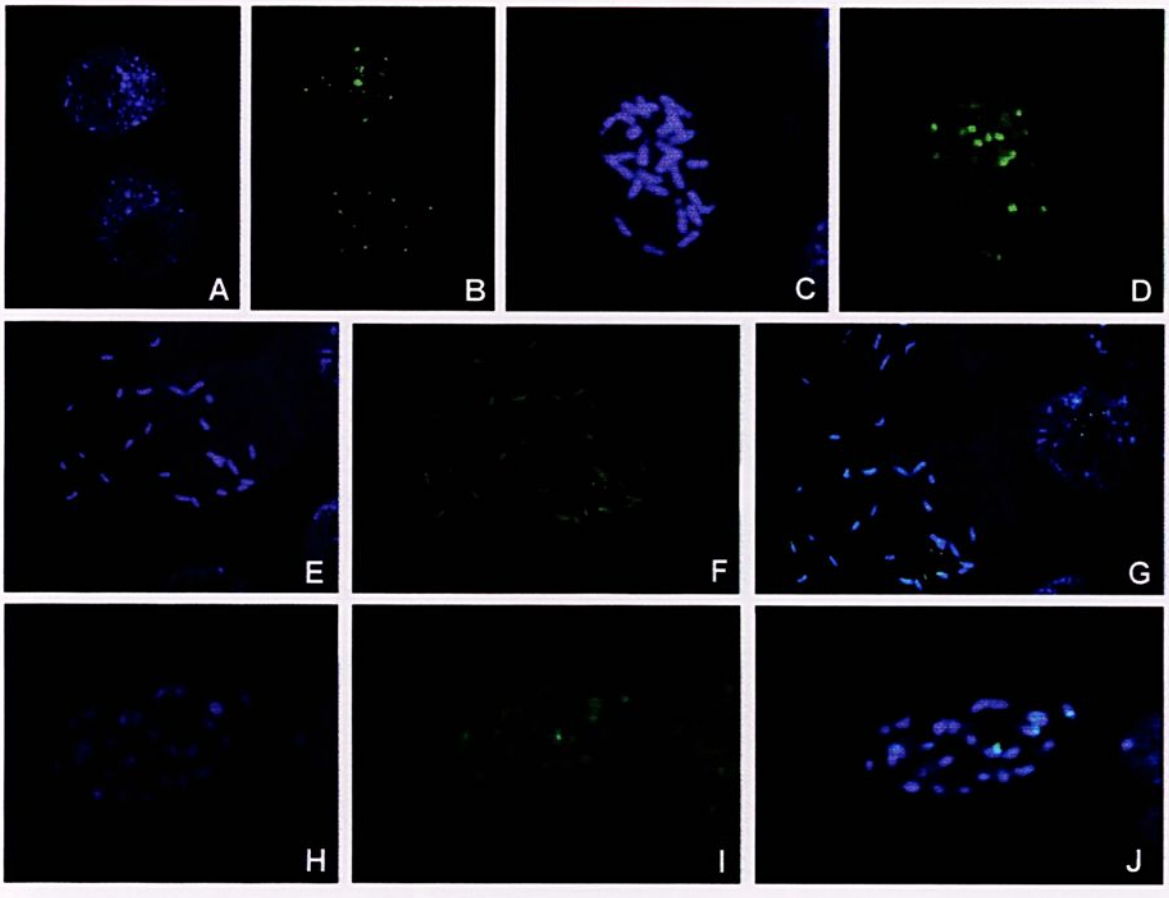


FIGURA 1:.Bandamento por fluorocromos base específicos (CMA/DAPI) em Leguminosa **A** e **B.**- núcleos de *Copaífera langsdorffii,* ;**C** e **D**. Metáfase mitóticas de *Copaífera langsdorffii ;* **E** e **F** Metáfase mitótica de *Hymenaea stigonocarpa;* **H, I** e **J**- metáfases de *Anadenanthera falcata.*

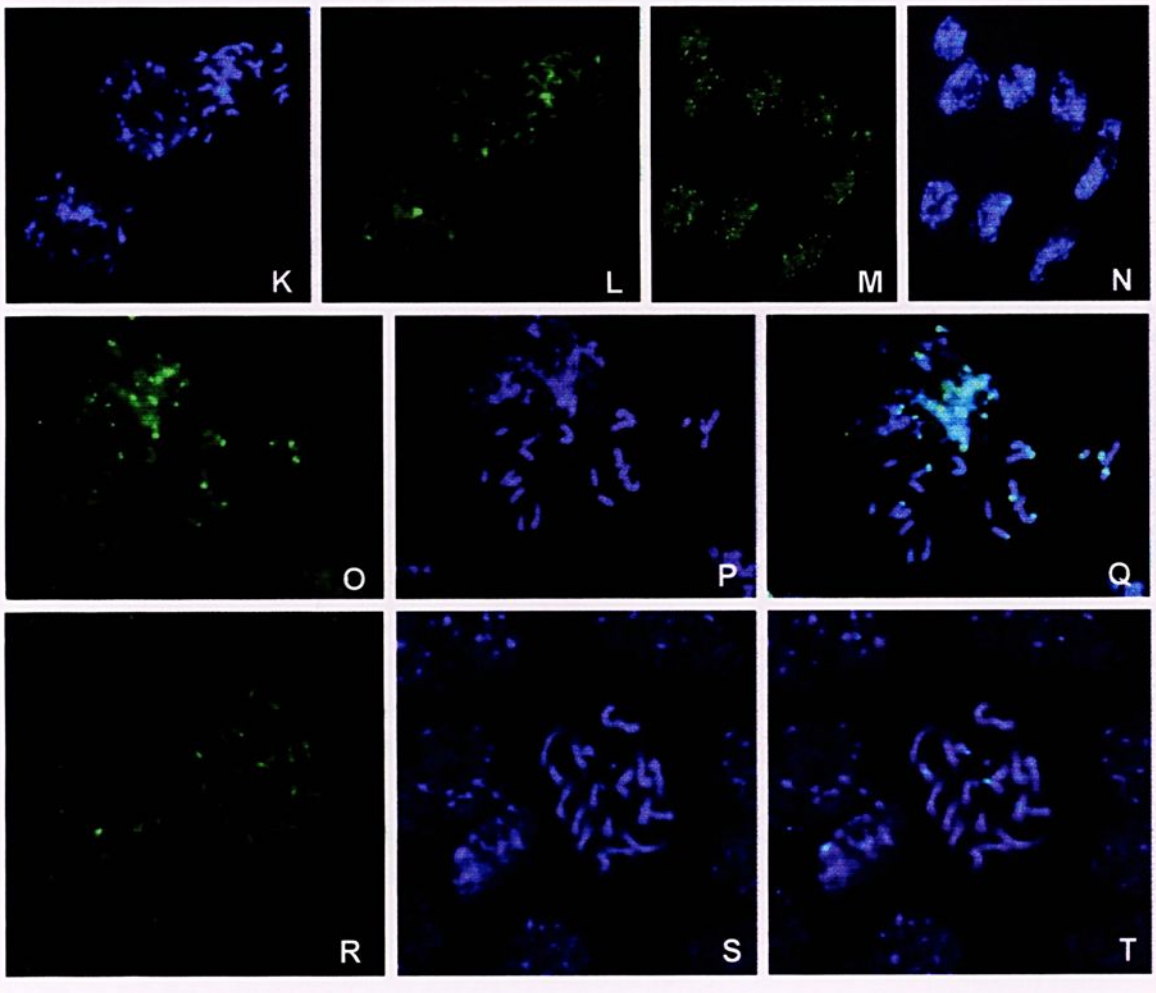


FIGURA 2: Bandamento por fluorocromos base específicos CMA/DAPI em leguminosas do cerrrado. **K** e **L.** metáfase mitóticas de Albizia polychephala, **M** e **N**- núcleos interfásicos de *Diptychandra aurantiaca,* **O, P** e **Q.** metáfase de *Diptychandra aurantiaca* , **R, S** e **T**- metáfases mitóticas de *Dalbergia miscolobium*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEL, G. Variação numérica de cromossomos e evolução nas Leguminosas. Tese de Doutorado, Piracicaba, USP, 138p. 1972.

JONES, K. Aspects of chromosome evolution in higher plants. **Adv. Bot. Res.**, London, v. 6, p. 119-195, 1978.

FUCHS, J.; STREHL S, BRANDES, A.; SCHEWEIZER, D.; SCHUBERT, L. Molecular-cytogenetic characterization of the Vicia faba genome - heterochromatin differentiation, replication patternsand sequence localization. **Chromosome Research**, [S.l], v. 6., p. 219-230, 1998.

GALASSO, M.F.; MAGGIANI, M.; CREMONINI R.; PIGNONE, D. Chromatin characterization by banding technique, in situ hybridization, and nuclear content in Cicer L. (Fabaceae). **Genome**. [S.l], v. 39, p. 258-265, 1996.

GORTNER, G.; NENNO, M.; WEISING, K.; ZINK, D.; NAGL, W.; KHAL, G. Chromossomal localization and distribuition of simple sequence repeats and the *Arabdopsis*-type telomere sequence in the genome of Cicer arietinum. **Cromosome Research**., [S.l], v. 6,97-106, 1998.

GREILHUBER, J. **Chromosomal evidence in taxonomy**. In: Heywood, V.H.; Moore, D.M. Current Concept in plant taxonomy. London, Academic Press. p: 157-180. 1984.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, Berlin, v. 58, p. 307-324, 1976.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Bot. Jour. Linn. Soc.**, Londres, v.144, p.181-191, 2004.

VOSA, C.G. Heterochromatin recognition with fluorochromes. **Chromosoma**, Berlin, v.30, p. 366-372, 1970.

VOSA, C.G. Heterocromatin classification in Vicia faba and Scilla sibirica.**Chromosome Today.**, [S.l], v.5, p. 185-192, 1976.

Capítulo 3

LOCALIZAÇÃO DE SÍTIOS DE DNAr 45S EM ESPÉCIES DE CAESALPINIACEAE, FABACEAE E MIMOSACEAE NATIVAS DO CERRADO BRASILEIRO

Autores: Ferreira, M.A.M.M.; Vanzela, A.L.L.; Marin-Morales, M.A.

RESUMO

No presente estudo foram investigada os os sítios de rDNA 45S de 9 espécies das famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae, nativas do cerrado de Três Lagoas-MS. As espécies estudadas exibiram uma variação de 2 a 8 sítios posicionados preferencialmente no braço curto dos cromossomos. A variação no número de sítios encontrados em cada espécie ocorreu mesmo entre espécies pertencentes à mesma família. Para as espécies de Caesalpiniaceae estudadas, *Dimorphandra mollis* e *Hymenaea stigonocarpa*, foram observados 2 e 4 sítios, respectivamente. As espécies de Fabaceae *Acosmium subelegans, Diptychandra aurantiaca e Dalbergia miscolobium* apresentaram 2 sítios e A. *dasycarpum* e *Dipterix alata,* 6 sítios. Nas espécies de Mimosaceae, *Anadenanthera falcata* e *Plathymenia reticulata* foram registrados 2 e 8 sítios, respectivamente.

Palavra-chave: Fabaceae, Caesalpinaceae, Mimosaceae, Hibridação *in situ* e DNAr 45S.

1. INTRODUÇÃO

O cerrado é uma importante formação vegetal brasileira, com uma composição florística diversificada e carcterística. Dentre as espécies vegetais comumente encontradas no cerrado destacam-se representantes das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Estudos de fitossociologia deste ambiente reportam que, juntas estas famílias somam 690 gêneros e cerca de 17.600 espécies (HUTCHINSON, 1964).

Poucos estudos utilizando as técnicas citogenéticas são realizados em plantas desta família, principalmente nas endêmicas de regiões tropicais.

Além das técnicas comumente usadas para se caracterizar a constituição cariotípica de espécies vegetais e animais, tais como coloração convencional, bandamento-C e de impregnação com nitrato de prata, a hibridação *in situ* vem se tornado importante ferramenta em estudos de caracterização cromossômica, uma vez que permite a localização de seqüências específicas do DNA em cromossomos metafásicos e no núcleo interfásico (MALUSZYNSKA e HESLOP-HARRISON, 1993).

Em plantas, o uso da técnica de FISH (Fluorescente *in situ* hybridization) permite estabelecer novos tipos de marcadores cromossômicos para análise cariotípica comparada, localizar diversos genes e seqüências repetitivas ao longo dos cromossomos e construir mapas físicos para diferentes espécies (GUERRA, 2004).

Dentre as diferentes seqüências de DNA repetitivo empregadas na técnica de hibridação *in situ*, a seqüência DNAr 45S (18S-5,8S-28S) é uma das mais usadas, seguidas das DNAr 5S, microssatélites e das seqüências

teloméricas. O mapemento físico dessas seqüências permite a investigação da evolução cariotípica e fornece subsídios para o melhor entendimento da organização de parte do genoma de um determinado grupo vegetal (GATT et al.; STACE 2000; SNOWDON et al. 2001; SUMNER 2003; GARNATJE et al. 2004).

Em plantas, encontramos muitas espécies que apresentam cromossomos com tamanho e morfologia muito semelhantes, o que dificulta sua identificação, quando avaliados apenas com metodologias de coloração convencional. Assim, a técnica de hibridação *in situ* tem contribuído com informações que permitem uma melhor caracterização para diferentes grupos vegetais. Em espécies nativas do cerrado, especialmente para as famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae, nenhum estudo usando hidridação *in situ* foi encontrado, o que justifica, no futuro, intensificar o uso desta técnica com diferentes tipos de sondas, como (DNAr 5S, telomérica), para as diferentes famílias nativas encontradas nas regiões de cerrado do Brasil. Assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar a variação no número e posição de sítios de DNAr 45S em espécies das famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae, nativas do cerrado, pela técnica de hibridação *in situ* a fim de estabelecer uma comparação mais minuciosa entre os homólogos de cada espécie e, conseqüentemente, entre as espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas nove espécies das famílias Caesalpiniaceae, Fabaceae e Mimosaceae, coletadas em região de cerrado da região de Três Lagoas, MS (Tabela 1).

As excicatas de todas as espécies estudadas encontram-se depositadas no herbário do Departamento de Ciências Naturais do Campus de Três Lagoas, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Meristemas radiculares foram obtidos a partir da germinação de sementes colocadas para germinar em placa de Petri, forradas com papel de filtro umedecido. Os meristemas, após coleta, foram pré-tratados com 8-hidroxiquiloneina (2mM), por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) por 12 horas à temperatura ambiente e depois mantidas no "freezer". Para a preparação das lâminas, os meristemas radiculares foram submetidos à digestão enzimática (celulase 2% + pectinase 20%), por 30 a 60 minutos a 37°C, dependendo da espécie, e então esmagados em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas guardadas em "freezer" (-20°C) ou após secas, submetidas à técnica de hibridação *in situ*.

A hibridação *in situ* seguiu protocolo descrito por Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), com modificações (Fregonezi et al., 2004). Foi usada a sonda de DNAr 45S, produzida a partir do genoma de trigo (pTa71), marcada com biotina por "nick translation".

Inicialmente, as preparações citológicas foram incubadas em uma solução de RNAse (100μg/mL), pós-fixadas em paraformaldeído 4%, desidratadas em uma série de etanol 70-100%. As lâminas foram colocadas para secar por, no máximo, 180 minutos.

unesp

A sonda marcada e adicionada à mistura de hibridação (50% de formamida, 20% de polietilenoglicol 50%, 10% de 2xSSC, 3,33% de SDS, 3,33% de DNA de bloqueio e 13,33% de sonda 45S) foi desnaturada a 70°C e, imediatamente resfriada em gelo, por 10 minutos. A desnaturação dos cromossomos foi realizada a 90° C por 10 minutos, 50° por 10 minutos usando banho-maria, e colocadas para hibridar a 37°C em câmara úmida "overnight". As lâminas foram então lavadas em 2xSSC e formamida 0,1xSSC, 2xSSC e 4xSSC 0,2%- Tween 20. A detecção da sonda foi feita com uma solução de avidina-FITC 1:100 (em BSA 5%) e os cromossomos contracorados com DAPI ou iodeto de propídio e as preparações montadas em antifade.

A análise foi feita em microscópio de epifluorescência Leika LB 4500.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos de hibridização *in situ*, realizados com a sonda sítios de DNAr 45S, realizados para nove espécies das famílias Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae foi observada uma variação de 2 a 8 sítios para as espécies submetidas, cujas localizações preferenciais ocorreram na porção terminal do braço curto dos cromossomos (Tabela1).

Na família Caesalpinaceae a espécie *Hymenaea stigonocarpa*, com 2n=24 cromossomos, apresentou 4 sítios de DNAr 45S, com os sinais mostrando variação no tamanho e na intensidade da fluorescência (Fig. 2e, 2f) Em *Dimorphandra mollis*, com número cromossômicos 2n=28, apenas 2 pequenos sítios de DNAr 45S foram observados, como pode ser visto na figura 2d.

Nas espécies *Acosmium subelegans* (2n=18), *Dalbergia miscolobium* (2n=20) e *Dipitychandra aurantiaca* (2n=20), pertencentes à família Fabaceae, foram observados 2 sítios de DNAr 45S, com sinais bem intensos de fluorescência (Fig. 1c, 2a e 1d, respectivamente). Já a espécie *Acosmium dasycarpum* e *Dipterix alata* exibiram 4 sítios com intensos sinais de fluorescência e 2 sinais menos intensos, como pode ser visto nas metáfases cromossômicas e nos núcleos interfásicos registrados nas figuras 1b, 1e, 1a e 1f, respectivamente.

Em *Anadenanthera falcata* e *Plathymenia reticulata*, da família Mimosaceae, foram observados 2 e 8 sítios de rDNA 45S, respectivamente. Dos 8 sítios observados em *P. reticulata*, dois deles foram de tamanho reduzido, sendo os outros mais intensamente visualizados (Fig 2b e 2c).

BIBLIOTECA
T. 1421/05

Para o estabelecimento do número de sítios de DNAr 45S de todas as espécies estudadas neste artigo, foram observadas as marcações presentes nos cromossomos metafásicos e nos núcleos interfásicos de dez células, para cada um dos materiais analisados.

Todas a espécies avaliadas neste estudo apresentaram sítios de hibridação DNAr 45S localizados na posição terminal do braço curto dos cromossomos. Contudo, foi observada uma variação entre essas espécies, quanto ao número e tamanho desses sítios, após a aplicação da técnica de hibridização in situ, realizada com sondas pTa71 (DNAr 45S de trigo).

As variações observadas entre as espécies estudadas nesta investigação foram de 2 a 8 sítios de DNAr. Das nove espécies avaliadas, cinco delas apresentaram 2 sítios (*Dimophandra mollis*, *Acosmium subelegans*, *Diptychandra aurantiaca*, *Dalbergia miscolobium* e *Anadenanthera falcata*), uma apresentou 4 sítios (*Hymenaea stigonocarpa*), 2 exibiram 6 sítios (*Acosmium dasycarpum* e *Dipteryx alata*) e uma 8 sítios (*Plathymenia reticulata*), como pode ser visto nas figuras 1 e 2 e Tabela 1.

As análises realizadas com as espécies *Hymenaea stigonocarpa* e *Plathymenia reticulata*, mostraram que houve, para estas espécies, uma variação quanto ao número e intensidade do sinal dos sítios marcados.

Para algumas metáfases e, ou núcleos interfásicos dessas espécies foram observados sítios adicionais, sempre em número de 2, que se mostraram mais fracamente marcados. Para a espécie *Hymenaea stigonocarpa* foram observados 4 sítios bem evidentes e 2 sítios menores, com marcação sutil, o que impossibilita a caracterização segura dos mesmos.



A mesma observação cabe para as avaliações realizadas com a espécie *Plathymenia reticulata*, cuja maioria das células apresentaram 8 sítios de DNAr 45S e apenas algumas células exibiram 10 sítios, sendo esses 2 sítios adicionais também mais fracamente marcados.

Foram observadas para algumas células da região apical das raízes de *Dalbergia miscolobium* a evidência de poliploidização, característica comum de células que compõem o tecido localizado acima da região que sobrepõem a região meristemática. Quando essas células foram submetidas à metodologia de FISH com sondas 45S, elas exibiram um número de marcação duas vezes maior que suas correspondentes diplóides. Com este resultado, podemos inferir que a células poliplóides, observadas para *Dalbergia*, eram, na realidade, células tetraplóides.

Para estudos mais conclusivos sobre a caracterização linear dos cromossomos desse grupo de plantas, sugerimos a aplicação de técnicas de hibridização *in situ* com outras sondas (teloméricas, centroméricas, DNAr 5S e sondas de DNA genômico do próprio grupo), que poderão acrescentar novas informações sobre a organização do material genético das espécies alvo deste estudo.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela 1. Espécies de leguminosas com os respectivos números de registro de coleção, sítios de DNAr 45S e número cromossômico encontrado.

Família/Espécies	Número de coleção	sítios de DNAR 45S	2n
Caesalpiniaceae			
Dimophandra mollis Benth.	MAC102	02	28
Hymenaea stigonocarpa Mart.	MAC103	04	24
Fabaceae			
Acosmium dasycarpum Yak.	MAF101	06	18
Acosmium subelegans Yak.	MAF102	02	18
Dipteryx alata Vog.	MAF104	06	16
Diptychandra aurantiaca (Mart.)	MAF105	02	22
Dalbergia miscolobium (Vog.)	MAF107	02	20
Mimosaceae			
Anadenanthera falcata (Benth.) Speg	MAM103	02	26
Plathymenia reticulata Benth	MAM105	08	26

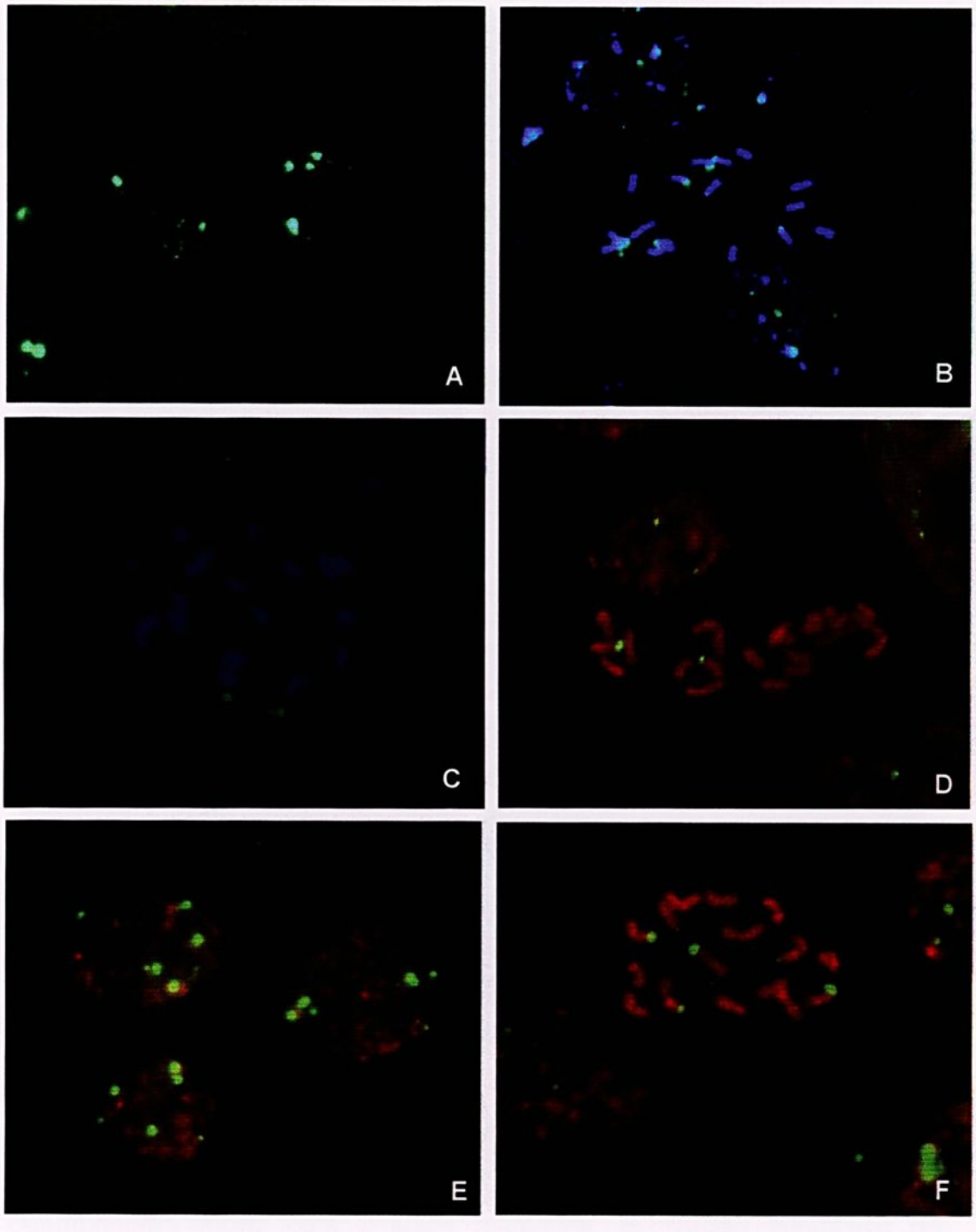


FIGURA 1: Localização de sítios de rDNA 45S em espécies nativas do cerrado. **A.** núcleo interfásico de *Acosmium dasycarpum* com 6 sítios marcados; **B.** Metáfase de *Acosmium dasycarpum* com 6 sítios marcados; **C.** *Acosmium subelegans* com 2 sítios marcados; **D.** *Diptychandra aurantiaca* com 2 sítios marcados; **E.** Núcleo interfásico de *Dipterix alata* com 6 sítios marcados e **F.** Metáfase de *Dipterix alata* com 6 sítios marcados.

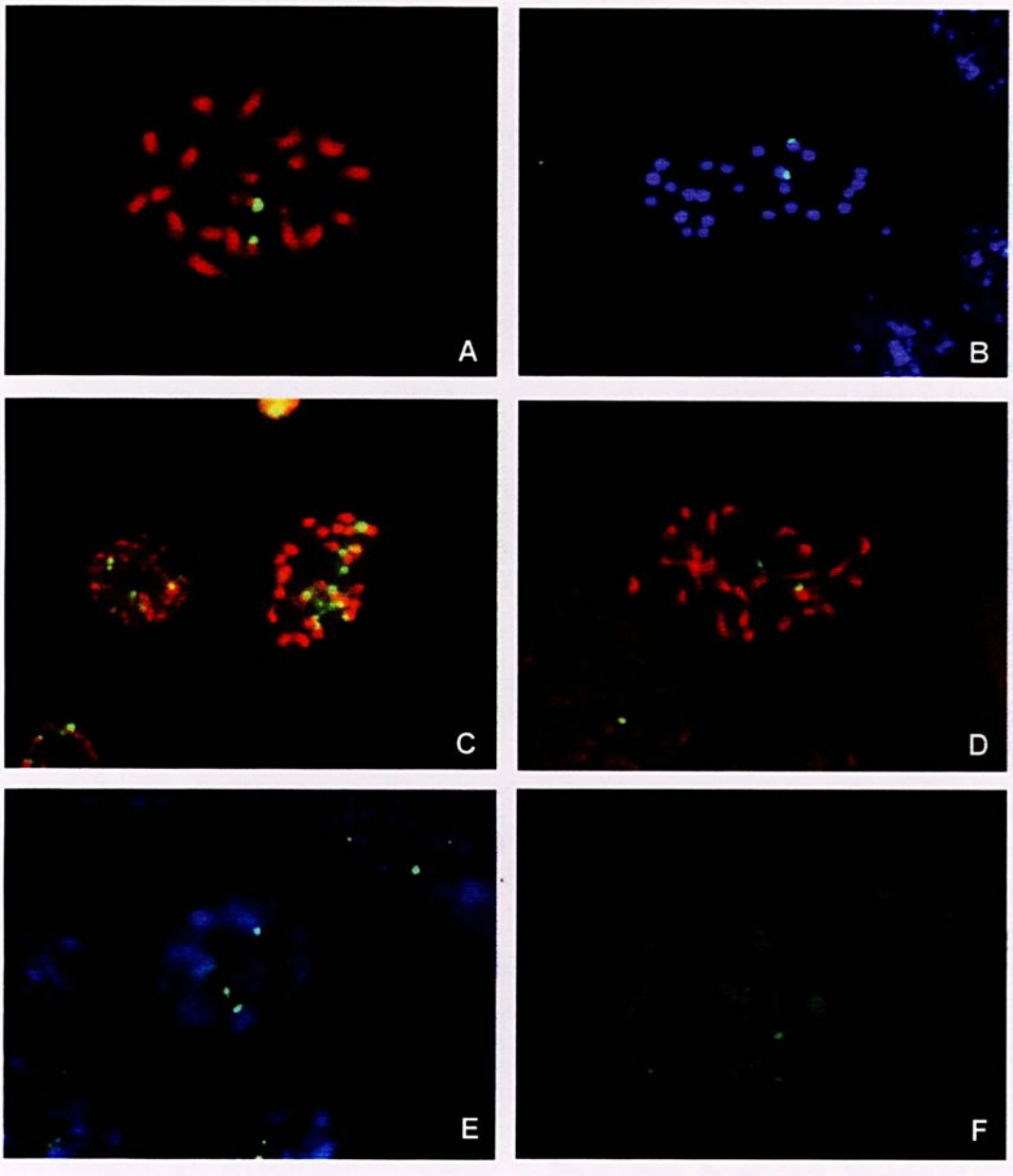


FIGURA 2: Localização de sítios de rDNA 45S em espécies nativas do cerrado. **A.** *Dalbergia miscolobium* com 2 sítios marcados; **B.** *Anadenanthera falcata* com 2 sítios marcados; **C.** *Plathymenia reticulata* com 8 sítios marcados; **D.** *Dimorphandra mollis* com 2 sítios marcados; **E.** Núcleo interfásico de *Hymenaea stigonocarpo* com 6 sítios marcados e **F.** metáfase.de *Hymenaea stigonocarpo* com 6 sítios marcados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeted DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 6x- *Triticale*. **Chrom. Res.**[S.l], v.2, p.231-238. 1994.

FREGONEZI, J. N.; TOREZAN, J. M. D.; VANZELA, A. L. L. A karyottpic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescense *in situ* hybridization with 45S rDNA probe and C-CMA$_3$. **Genet. Mol. Biol**. Ribeirão Preto, v. 27(2). 2004 (in press).

GARNATJE, T.; VALLÈS, J.; VILATERSANA, R.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and relates genera (Asteraceae, Cardueae). **Plant. Biol.** Stuttgart, v.6, p.140-146. 2004.

GUERRA, M. **FISH- Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 176. 2004.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI. M. E LEITCH, I. J. *In situ* hybridation with automated chromosome denaturation. **Technique**, [S.l], v.3, p.106-109. 1991.

MALUSZYNKA, J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Molecular cytogenetics of the genus *arabidopsis*: *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. **Ann. Bot.** [S.l], v.71, p. 479-484, 1993.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, T. **Proc. Natl. Acad. Sci**. Allahabad USA, v. 83, p. 293, 1986.

SNOWDON, R.; KUSTERER, B.; HORN, R. Strutural genome analysis using molecular cytogenetic thechniques. **Progr. Bot.** [S.l], v.63, p.55-79. 2001.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. **Taxon.** Stuttgart, v.49: p.451-477. 2000.



2. CONCLUSÕES

O uso de técnicas citogenéticas de coloração convencional, aplicadas em espécies de Leguminosas de ecossistemas de cerrado, foram importantes metodologias para o reconhecimento da variação do número cromossomos encontrados dentro deste grupo (2n=16 a 2n=28), bem como para o estabelecimento da morfologia de seus cromossomos e para a análise dos núcleos interfásicos. Para as espécies analisadas neste trabalho, foram observados núcleos interfásicos dos tipos arreticulados ou semirreticulados.

O bandamento com fluorocromos base específico CMA_3 e DAPI evidenciou uma quantidade significativa de bandas CMA_3 positivas, com bandas DAPI negativas correspondentes, para todas as espécies submetidas a esta metodologia. Na espécie *Copaífera langsdorffii* foram registradas bandas compostas por grandes blocos, para quase todos cromossomos, o que indica ser esta espécie um ótimo material para ser investigados por outros ensaios, utilizando outros sondas e diferentes técnicas moleculares.

A técnica de hibridação *in situ* com sonda DNAr 45S, evidenciou uma variação de número de sítios (2 a 8), por complemento cromossômico, além de ter identificado uma variação também quanto ao tamanho do sinal. Novos estudos com estas espécies deverão ser realizados, para que possam ser obtidas mais informações que permitam entender os processos evolutivos atuantes neste grupo, e, assim, completar as poucas informações deste material.



3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. C-banding in maize. I. Band patters. **Caryologia**, Firenze, v.38, p. 23-30. 1985.

BANDEL, G. **Variação numérica de cromossomos e evolução nas Leguminosas.** Tese de Doutorado, Piracicaba, USP. 138p. 1972.

BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the *Leguminosae*. **Caryologia**, Firenze, v.27, p.17-32. 1974.

BATTISTIN, A.; VARGAS, M. G. A cytogenetic study of seven species of *Centrosema* (DC.) Benth (Leguminosae-Papilionoideae). **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 319-329. 1989.

BURKART, A. **Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. Acme Agency. 2º ed. Buenos Aires. 569p. 1952.

CAI, Q.; LU, S.; CHINNAPPA, C. C. Analysis of karyotype and giemsa C-banding patterns in eight species of *Arachis*. **Genome,** Ottawa, v. 29, p.187-194.1987.

CALDERINI, O.; PUPPILLI, F.; CLUSTER, P. D.; MARIANI, A.; ARCIONI, S. Cytological studies of the nucleolus organizing regions in the *Medicago* complex: *sativa-coeruela-falcata*. **Genome**, Ottawa, v. 39, p.914-920. 1996.

COLEMAN, J. R.; DE MENEZES, E. M. Chromosome number in the Leguminosae from the State of São Paulo, Brazil. **Rhodora**, Cambridge v.82, p.475-481. 1980.

COLEMAN, J. R. Chromosome number of Angisperms collected in the State of São Paulo. **Rev. Bras. Genet.** Ribeirão Preto, v.5, p. 533-549. 1982.

COUTINHO, L. M. O conceito de cerrado. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v.1, p. 17-23. 1978.

COUTINHO, L. M. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciência Hoje.**, São Paulo, v.68, p. 22-30. 1990.

COX, A. V.; BENNETT, S. T.; PAROKONNY, A. S.; KENTON, A.; CALLIMASSIA, M. A.; BENNETT, M. D. Comparasion of plant telomer locations using a PCR-genetated synthetic probe. **Ann. Bot.**, Roma, v.72, p. 239-247. 1993.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas flowering plants**. George Allen & Unwin LTDA. London. 519p. 1955.

EHRENDORFER, F. Quantitative and qualitative differentiation of nuclear DNA in relation to plant systematics and evolution. In: **proteins and nucleic acid plant systematics.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p: 3-35. 1983.

FEDOROV, A. **Chromosome numbers of flowering plants**. Academy of Sciences of the URSS. Komarov Botanical Institute., 926p. 1964.

FERNANDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolución em *Arachis*. **Bonplandia,** Corrientes**,** v. 8, p. 187-220. 1994.

FERRI, M. G. Os cerrados de Minas Gerais. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v.27, p. 1217-1220. 1975.

FERRI, M. G. **Ecologia dos cerrados**. In: FERRI, M. G., coord. IV Simpósio sobre o cerrado: bases para utilização agropecuária. São Paulo, EDUSP, Belo Horizonte, Itatiaia. p. 15- 36. 1977.

FORNI-MARTINS, E. R. **Estudos Citotaxonômicos no complexo *Phaseolus-Vigna-Macroptilium* (Leguminosae Papilionoideae).** Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1984.

FUCHS, J.; SCHUBERT, I. Localization of seed protein genes on metaphase chromosomes of *Vicia faba* via fluorescent *in situ* hybridization. **Chromos. Res.**, Oxford, v.3, p.94-100. 1995.

GALASSO, I.; FREDIANI, M.; CREMONINI, R.; PIGNONE, D. Chromatin characterization by banding techniques, *in situ* hybridization, and nuclear content in *Cicer* L. (Leguminosae) **Genome.,** [S.l], v. 39, 258-265. 1996.

GIBBS, P. E.; INGRAM, R. Chromosome numbers of some Brazililian flowering plants. **Notes Royal Botanical Garden Edinburg** [S.l], v. 40, p. 399-407. 1982.

GRATTAPAGLIA, D.; MALLEY, D.; SEDEROFF, R. **Multiple aplications of RAPD markers to analysis in *Eucalyptus sp.* Resolving tropical forest resource concerns through tree improvement, gene conservation and domestication of new species** - IUFRO. P.436-450. 1992.

GREILHUBER, J. **Chromosomal evidence in taxonomy**. In: Heywood, V.H.; Moore, D.M. Current Concept in plant taxonomy. London, Academic Press. p: 157-180. 1984.

GUERRA, M. S. **Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas**. In: Aguiar-Perecin, M.L.R.; Martins, P.S.; Bandel, G, eds. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. São Paulo:Sociedade Brasileira de Genética, 1985a. p: 137-153.

GUERRA, M. S. Cytogenetics de Rutaceae III. Heterochromatin patterns. **Caryologia**, Firenze, v. 38, p. 335-346, 1985b.

GUERRA, M. S. Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). **Plant. Syst. Evol.**,[S.l], v. 158, p. 107-115. 1988.

GUERRA, M. S. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara pp.146. 1988.

GUERRA, M. S. Patterns of heterochromatin distribuition in plant chromosomes. **Gen. Mol. Biol**. Ribeirão Preto, v. 23, p.1029-1041. 2000.

HERINGER, E. P.; BARROSO, G. M.; RIZZO, J. A. ; RIZZINI, T. **A flora do cerrado**. In: Simpósio sobre o cerrado: bases para utilização agropecuária. EDUSP, Belo Horizonte, Itatiaia, p.211-231. 1977.

HUSBAND, B. C. Chromosomal variation in plant evolution. **Am. J. Bot.**, [S.l], v. 9, p. 621-625. 2004.

HOWELL, W .M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**, Araraquara, v.36, p.1014. 1980.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants**. Dicotyledones, vol.I. Clarendon Press, Oxford. 516 pp. 1964.

JOLY, C. A .; FELIPE, G. M.; MELLHEM, T. S. Taxonomic studies in *Magonia* St. Hill (Sapindaceae). **Brittonia**, Bronx, v. 32, p.380-386. 1980.

JONES, K. Aspects of chromosome evolution in higher plants. **Adv. Bot. Res.**, London, v. 6, p. 119-195. 1978.

KLANT, A. & SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 463-467. 2000.

MASOUD, S. A., GILL, B. S. & JOHSON, L. B. C-banding of alfafa chromosomes: standard karyotype and analysis of a somaclonal variant. **J. Hered.**, Uttar Pradesh, v. 82, p. 335-338. 1991.

MORAWETZ, W. Karyological races and ecology of the Brazilian *Duguetia furfuracea* as compared with *Xylopia aromatica* (Annonaceae). Flora, **Jena**, Berlin, v. 175, p. 195-209. 1984.

MORAWETZ, W. Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. **Pl. Syst. Evol.**, [S.l] v. 152, p. 49-100. 1986.

MORAWETZ, W.; LE THOMAS, A. Karyological and systematics of the genus *Ambavia* and other *Annonaceae* from Madagascar. **Pl. Syst. Evol.**, [S.l], v. 158, p. 155-160. 1988.

NAGL, W. Two human DNA sequences (aromatase, telomere) detected in *Phaseolus* (Fabaceae) by respectively blot and *in situ* hybridization. **Polish Bot. Stud.**,[S.l], v. 2, p. 159-154. 1991.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E.; BARBOSA, A. A.; TALAVERA, S. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacacaeae) species of the Brazilian cerrados. **Pl. Syst. Evol.**, [S.l.], v. 179, p. 207-219. 1992.

OLIVEIRA, L. P. C. & AGUIAR-PERECIN. M. L. R. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* (Leguminosae). **Cytologia**,Tokyo, v. 64, p. 165-174. 1999.

PLOWMAN, T.; RUDENBERG, L.; GREENE, C. W. In: Chromosome Number reports LX (Love, A ., ed.). **Táxon**, Utrecht, v. 27, p. 223-231. 1978.

RAMSAY, G. **C-banding in *Vicia* species**. In: Systemes for Cytogenetic analysis in *Vicia faba* L. (Chaoman, G. P. and Tarawali, S.A., eds.). Nijhoff/ Junk Publishers, dordrecht, pp. 28-39. 1984.

RAWLINS, D. J.; HIGHETT, M. I., SHAW, P. J. Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. **Chromosoma.**, Berlin, v. 100, p. 424-431, 1991.

RIZZINI, C. T. **A flora do cerrado** – análise Florística das savanas centrais. In: FERRI, M. G. (coord.). I simpósio sobre o cerrado. EDUSP, p.125-177. 1963.

SARKAR, A . K.; DATTA, N.; CHATERJEE, U.; HAZRA, D. Chromosome Number Reports LXXVI. **Taxon**, Utrecht, v. 31, p. 576-579, 1978.

SATO, S., HIZUME, M., KAWAMURA, S. Relathionship between secondary constrictions and nucleolus organizing regions in A*llium cepa*. **Caryologia**, Firenze, v. 34, p.431-440.1987.

SCHUBERT, I. Telomeric polymorphism in *Vicia faba*. **Biol.**, Zentralblatt, v. 111, p. 164-168. 1992.

SCHWARZACHER, T., AMBROS, P., SCHWEIZER, D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant. Syst. Evol.**,[S.l], v. 134, p. 293-297. 1980,

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, Berlin, v. 58, p. 307-324, 1976.

SENN, H. A. Chromosome numbers relationship in the Leguminosae. **Bibliografia Genética**, [S.l], v. 12, p.175-536. 1938.

SINGHAL, V. K.; GILL, V. S.; BIR, S. S. Cytological studies in some members of *Malpighiaceae*. **Cytologia**, Tokyo, v. 50, p. 1-8. 1985.

SNEFF, M. I.; HICKENBICK, M. C. M.; PAIM, N. R. Cytogenetics studies in species of the genus *Vigna savi* (Leguminosae-Papilionoideae). **Rev.Bras.Genet.**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 407-418. 1992.

STACE, C. A. Plant Taxonomy and Biosystematics. 2 ed. New York, Cambridge University Press, 1989.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia University Press. New York, 643p 1957.

SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A J. F; MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. **Introdução à Genética**. 4 edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1989.

TURNER, B. L. & FEARING, O. S. Chromosome numbers in the Leguminosae. II. African species, including phyletic interpretations. **Am. J. Bot.**, [S.l], v.46, p. 49-57. 1959.

UNAL, F., WALLACE, A. J. & CALLOW, R. S. Diverse heterochromatin in *Lathyrus*. **Caryologia.**, Firenze, v. 48, p. 47-63. 1995.

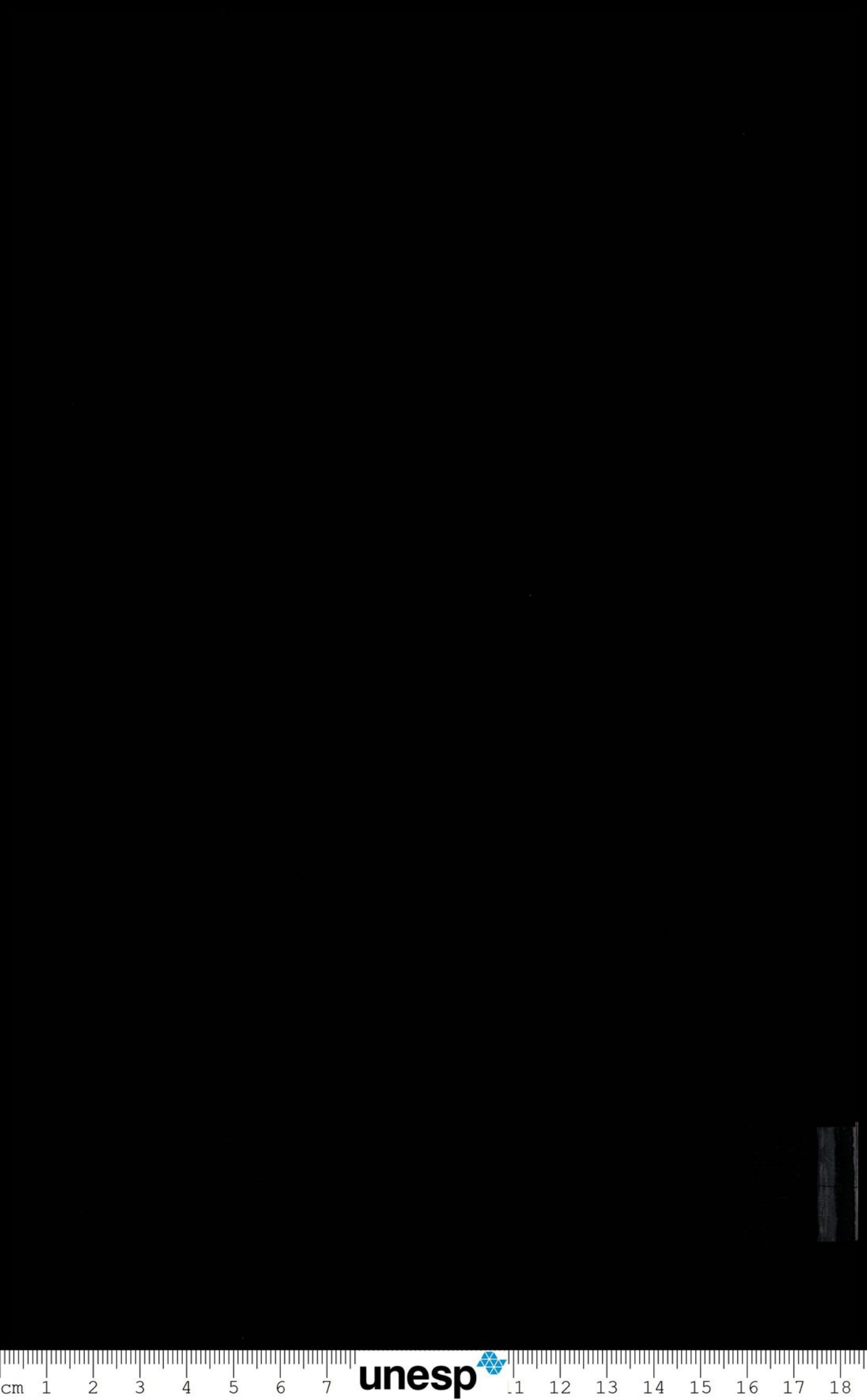
VOSA, C. G. **Plant chromosome banding and cytotaxonomy**. In: Aguiar-Perecin, M.L.R.; Martins, P.S.; Bandel, G, eds. Tópicos de citogenética e evolucão de plantas. São Paulo:Sociedade Brasileira de Genética. p.17-25. 1985.

ZHENG, J., NAKATA, M., UCHIYAMA, H. & TANAKA, R. Giemsa-C banding patterns in several species of *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 56, p. 459-466. 1991.

WANSCHER, J. H. The basic chromosome number of the higher plants. **New Phytologist.**,. [S.l], v.33, p. 101-126. 1934.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

WILLIANS, J.G.K. e col. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleid Acids Research.**, 18: 6531-6535. 1990.


cm 1 2 3 4 5 6 7
unesp
11 12 13 14 15 16 17 18