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

**Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* (L.) da seção Hedriocarpae,
subseção Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae)**

Andressa Gois Morales

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2008**

Andressa Gois Morales
Bióloga

**Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* (L.) da seção Hedriocarpae, subseção
Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae)**

Orientador:

Prof. Dr. MATEUS MONDIN

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Morales, Andressa Gois

Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* (L.) da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae) / Andressa Gois Morales. - - Piracicaba, 2008.

70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Cariótipos vegetais 2. Cromossomos vegetais 3. Crotalária 4. Marcador molecular
Título

CDD 633.652

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Dedico:
À minha mãe Dirce e à memória
de meu pai Osvaldo, por serem os
pilares de minha formação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita sabedoria....

Ao Prof. Dr. Mateus Mondin, meu orientador, pela paciência, amizade e ajuda, que sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq e à CAPES pela concessão das bolsas de estudo.

À ESALQ e ao Departamento de Genética que permitiram a realização deste trabalho.

Aos professores pelos ensinamentos e disposição em ajudar.

À Profª. Dra. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin, pelo apoio e sugestões apresentadas.

À Profª. Dra Ana Lúcia Dias, pela amizade e incentivo.

À técnica Silva Cristina Menuzzo Molina, pela grande amizade e ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas: Maiara, Cecília, Daniel, Renato e Renata, pelos momentos de descontração e incentivo.

Aos amigos Antônio (mais conhecido como Berdan), Fernandinho e Valdir, pelos momentos descontraídos e pela disponibilidade em sempre ajudar.

Aos funcionários do Campo, por me ajudarem sempre que precisei.

À minha companheira de casa Michelle e a todos meus amigos de Piracicaba pelo incentivo, ajuda, compreensão e momentos inesquecíveis.

Aos amigos Thiago e Jérica, pela amizade e companheirismo.

Às minhas grandes amigas Mariana e Carol que mesmo longe sempre me apoiaram.

Ao Celso, por estar ao meu lado em todos os momentos, me ensinando a ver a vida de uma maneira especial, me incentivando e me apoiando em momentos difíceis, tornando-os mais fáceis de lidar.

Ao meu pai e meu anjo Osvaldo (*in memoriam*), que enquanto comigo me ensinou o verdadeiro valor da vida e que mesmo distante sempre estará ao meu lado.

À minha mãe Dirce e minhas irmãs Angélica e Aracelis pelo eterno amor, carinho, incentivo em mim depositado e que sem eles eu não conseguiria chegar até aqui.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O GÊNERO <i>CROTALARIA</i>	13
2.2 A CITOGENÉTICA DO GÊNERO <i>CROTALARIA</i>	15
2.3 OS GENES RIBOSSOMIAIS E AS REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLEÓLO (RON) COMO MARCADORES PARA ESTUDO DA EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.2 MÉTODOS.....	30
3.2.1 GERMINAÇÃO.....	30
3.2.2 PRÉ-TRATAMENTO DE RAÍZES COM INIBIDORES DO FUSO MITÓTICO.....	30
3.2.3 Métodos DE PREPARAÇÕES DE LÂMINAS	30
3.2.4 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE FEULGEN.....	31
3.2.5 COLORAÇÃO COM FLUOROCROMOS.....	31
3.2.5.1 COLORAÇÃO COM DAPI (4'-6'- DIAMIDINO-2-FENILINDOL).....	31
3.2.5.2 COLORAÇÃO COM DAPI/AMD (4'-6'- DIAMIDINO-2FENILINDOL/ACTINOMICINA D)	32
3.2.5.3 COLORAÇÃO COM CMA (CROMOMICINA A ₃)	32
3.2.5.4 COLORAÇÃO COM CMA/DA (CROMOMICINA A ₃ /DISTAMICINA)	33
3.2.6 HIBRIDAÇÃO MOLECULAR IN SITU FLUORESCENTE (FISH)	33
3.2.6.1. SONDAS.....	33
3.2.6.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL DE ESPÉCIES DE <i>CROTALARIA</i>	33
3.2.6.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE RNA RIBOSSÔMICO 5S.....	34
3.2.6.4 MARCAÇÃO DAS SONDAS E HIBRIDAÇÃO MOLECULAR <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE DAS SONDAS DE DNAs RIBOSSOMIAIS 45S E 5S.....	34
3.2.7 MICROSCOPIA E ANÁLISE DE IMAGENS.....	35
3.2.8 MEDIDAS DOS CROMOSSOMOS.....	35
4 RESULTADOS	37
5 DISCUSSÃO	52
5.1 ESTRUTURA DOS CARÍOTIPOS	52

5.2 EVOLUÇÃO CAROTÍPICA DO GÊNERO <i>CROTALARIA</i> ATRAVÉS DO USO DE MARCADORES CITOGENÉTICOS.....	56
6. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE.....	69

RESUMO

Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* (L.) da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae)

O gênero *Crotalaria* possui aproximadamente 600 espécies descritas, localizadas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estas espécies estão classificadas em oito seções e nove subseções botânicas definidas principalmente com base em caracteres florais. Estas seções botânicas podem ser subdivididas em dois grupos principais: um de espécies com flores especializadas e outro de espécies sem especialização das flores. Estudos citogenéticos anteriores mostraram que as características cromossômicas são conservadas dentro de uma mesma seção ou subseção botânica e foi proposto que as espécies com especialização das flores teriam uma organização cromossômica diferente das espécies sem especialização das flores. Dentro deste contexto, foram descritos os cariótipos e a organização do genoma de três espécies e duas sinonímias, da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae, com a utilização de coloração convencional dos cromossomos pelo método de Feulgen, de coloração com fluorocromos específicos às regiões cromossômicas ricas em GC ou AT e mapeamento físico por hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) dos locos de DNA ribossômicos 45S e 5S. A obtenção de marcadores cromossômicos característicos para esta subseção e a construção de mapas citogenéticos possibilitaram a identificação de uma inversão pericêntrica, de eventos de transposição e da diferenciação na natureza das seqüências de DNA da heterocromatina pericentromérica, previamente descrita em espécies com flores especializadas como ricas em GC. Estes resultados revelaram alguns dos eventos citogenéticos ocorridos durante a diversificação do gênero, sendo que a subseção Macrostachyae é caracterizada por uma inversão no cromossomo 1 que pode ter uma origem antiga no gênero e que espécies sem especialização das flores, de fato possuem uma organização cromossômica distinta das espécies com flores especializadas, principalmente quanto à natureza das seqüências de DNA da heterocromatina pericentromérica.

Palavras-chave: *Crotalaria*; rDNA 45S; rDNA 5S; Bandamento cromossômico; Evolução cariotípica

ABSTRACT

Karyotype evolution of *Crotalaria* (L.) species of the Hedriocarpae section, Macrostachyae subsection (Leguminosae-Papilionoideae)

Approximately 600 species of the Genus *Crotalaria* have been described, the majority is located in tropical and subtropical regions. These species are classified into eight botanical sections and nine subsections according to floral characteristics. The botanical sections can be divided into two major groups: one with species presenting flower specialization and the other without flower specialization. Previous cytogenetic studies showed that chromosomal features are conserved within the same botanical section or subsection, and it has been suggested that species with flower specialization have a different chromosomal organization from those species without flower specialization. In this context, the karyotypes and genome organization of five species (being three synonymy from the Hedriocarpae section, Macrostachyae subsection) were described by conventional chromosome staining using Feulgen, specific fluorochrome staining to GC or AT chromosomal rich regions and physical mapping by fluorescent *in situ* molecular hybridization of 45S and 5S ribosomal genes. The mapping of specific chromosome markers and construction of cytogenetic maps of this section have allowed us to identify a pericentric inversion, transposition events and a differentiation in the nature of DNA sequences of the pericentromeric heterochromatin, previously described as GC-rich in species with flower specialization. The results reveal diverse cytogenetic events that occurred during the genus diversification: the Macrostachyae subsection showed a pericentric inversion in the chromosome pair 1 (presumably of ancient origin) while species without flower specialization are characterized by a distinct chromosomal organization, mainly concerning the nature of DNA sequences of pericentromeric heterochromatin.

Key-words: *Crotalaria*, rDNA 45S, rDNA 5S, Chromosomal banding, Karyotype evolution

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) possui uma grande diversidade de espécies, localizadas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O continente Africano é o centro primário de diversidade onde 550 espécies foram descritas; o Americano é o centro secundário de diversidade onde foram descritas 70 espécies, sendo que destas, 31 foram classificadas como endêmicas. Índia e Austrália também são consideradas centros de diversidade, entretanto, não há descrições precisas sobre o número de espécies encontradas nestes dois países. A sistemática do gênero é baseada em características morfológicas e na presença de apêndices e peças florais que permitem um maior ou menor grau de especialização a polinização cruzada realizada por insetos. Com base nestas características florais as espécies foram agrupadas em seções e subseções botânicas e o gênero pôde ser dividido em dois grupos principais, o primeiro com as seções sem especialização floral e o segundo com as seções que apresentam especialização floral (revisão em BISBY; POLHILL, 1973; POLHILL, 1982; FLORES; MIOTTO, 2005; FLORES, 2004).

As espécies do gênero *Crotalaria* são de grande importância para a agricultura dos países tropicais e são utilizadas principalmente como adubo verde para cobertura do solo e combate à erosão, como fertilizante devido a sua capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e como agente biológico no controle das áreas infectadas com nematóides. Além disso, são utilizadas na produção de fibras e celulose de alta qualidade (MEDINA, 1959; POLHILL, 1982). Há um interesse crescente da indústria farmacêutica em substâncias do metabolismo secundário de espécies de *Crotalaria*, como alguns alcalóides que apresentam atividade como anti-inflamatórios e anti-hepatotóxicos (AHMED; AL-HOWIRINY; MOSSA, 2006) e outras substâncias que auxiliam na função imune, na prevenção e tratamento de câncer (UNIV HOSEO ACADEMIC COOP FOUND, 2007).

A maior parte dos estudos citogenéticos no gênero *Crotalaria* está restrita principalmente a contagem do número de cromossomos (ATCHINSON, 1950; BOULTER et al., 1970, FLORES et al., 2006) e a descrição dos cariótipos de algumas espécies (GUPTA; GUPTA 1978a, 1978b; RAINA; VERMA, 1979; VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984; PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; TAPIA-PASTRANA, et al., 2005; ALMADA; DAVIÑA; SEIJO, 2006).

A análise de cerca de 150 espécies mostra que o número de cromossomos é praticamente constante, isto é $2n=16$; que apenas um grupo restrito de espécies e subespécies africanas possui $2n=14$ e que no continente Americano predominam espécies poliplóides com $2n=32$ (revisão em MONDIN, 2003 e referências neste). Em decorrência destes estudos, estabeleceu-se que o número básico de cromossomos para o gênero é $x=8$ ($2n=2x=16$; $2n=4x=32$), porém $x=7$ também é mencionado, baseado em espécies, como *C. incana*, com $2n=14$. Este último pode ser derivado de $x=8$, por aneuploidia ou por rearranjos estruturais acarretando na perda de um par de centrômeros (GUPTA; GUPTA, 1978a., PALOMINO; VÁRQUEZ, 1991).

A descrição dos cariótipos mostra que as espécies possuem um gradiente de redução do tamanho dos cromossomos e um aumento do índice de assimetria dos cariótipos, que coincide com o aumento do grau de especialização das flores (BOULTER, et al., 1970; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999).

A análise citogenética através de técnicas de bandamento cromossômico (bandamento C e fluorocromos) e hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) dos genes ribossomais 18S-5.8S-26S (abreviado rDNA45S) e 5S, de cinco espécies, sendo quatro com flores especializadas e uma com flores sem especialização, permitiu as seguintes observações: 1) As espécies com flores especializadas possuem regiões heterocromáticas pericentroméricas ricas em GC (CMA^+ - CMA/DA^-), sítios de rDNA 45S e 5S riquíssimos em GC (CMA^+ - CMA/DA^+) e colinearidade destes locos nas espécies diplóides, e perda de sequências ribossomais durante a evolução de espécies poliplóides; 2) As espécies sem especialização floral não possuem regiões heterocromáticas pericentroméricas ricas em GC, mas possuem regiões ricas em AT em posições terminais e intersticiais dos braços cromossômicos, sítios menores de rDNA 45S na região telomérica de alguns cromossomos e há uma perda de sintenia dos locos de rDNA 45S e 5S em relação as espécies diplóides de flores especializadas, provavelmente como resultado de uma translocação (MONDIN, 2003, MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007, MONDIN, et al., 2007a; MONDIN, et al., 2007b).

Os resultados encontrados por Mondin (2003) indicam que há uma diferença na organização dos genomas entre espécies de flores especializadas e flores não especializadas, porém estes resultados basearam-se apenas em uma espécie com flores não especializadas.

Sendo assim, neste trabalho foram caracterizadas três espécies e duas sinônimas, pertencentes à seção Hedriocarpae, com flores não especializadas, através do bandamento com

fluorocromos específicos a regiões ricas em AT e GC, além do mapeamento dos rDNAs 45S e 5S via hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH).

Os resultados obtidos através destas técnicas permitiram a caracterização dos cromossomos das espécies de *Crotalaria* da seção Hedriocarpae, bem como forneceram marcadores cromossômicos que permitiram o entendimento da reorganização cromossômica durante o processo de diversificação do gênero.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Crotalaria*

A família Leguminosae, também denominada Fabaceae, possui 727 gêneros com mais de 19000 espécies aproximadamente e está subdividida em três subfamílias: Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae (LEWIS, et al., 2005).

A subfamília Papilionoideae é a maior dentro da família Leguminosae, com 12000 espécies distribuídas em 483 gêneros (LEWIS, et al., 2005), além de ser amplamente distribuída e a mais diversificada, inclui a maior parte das espécies domesticadas para consumo humano e forrageiro (GEPTS et al., 2005).

Esta subfamília está dividida em quatro grupos principais: o grupo basal, a aliança genistóide, o conjunto das tribos tropicais e a aliança galegóide (POLHILL, 1981). A aliança genistóide é constituída das tribos Euchrestae, Thermopsidae, Podalyrieae, Lipariae, Genistae, Crotalariae, e alguns gêneros de Sophoreae. Dentro da tribo Crotalariae está incluído o gênero *Crotalaria*. (POLHILL, 1981, DOYLE, et al., 2000).

Este gênero possui aproximadamente 600 espécies descritas, distribuídas nos trópicos e subtropicos (POLHILL, 1982). No Brasil foi relatada a ocorrência de 42 espécies do gênero *Crotalaria*, sendo 31 espécies nativas e 11 exóticas (FILLIETAZ, 2002, FLORES, 2004).

O centro primário de diversidade é o continente Africano, principalmente no centro sul e leste da África, com cerca de 550 espécies descritas, seguido do continente Americano com 70 espécies descritas, destas 31 consideradas endêmicas (POLHILL, 1982; FLORES, 2004).

O habitat de *Crotalaria* é limitado por alguns fatores ambientais. As espécies pertencentes a esse gênero necessitam de alta incidência de luz, sendo sensíveis a geadas e a aridez extrema, além de possuírem uma desvantagem competitiva em relação às gramíneas (POLHILL, 1982). No Brasil o gênero é encontrado em ambientes abertos como cerrados e campos, podendo estar associado a bordas de mata ciliar (FILLIETAZ, 2002; FLORES, 2004; FLORES; MIOTTO, 2005).

A classificação infragenérica proposta por Polhill (1968) inicialmente dividiu o gênero em onze seções botânicas, baseada apenas nas morfologias florais. A partir de estudos utilizando a taximetria como ferramenta para a taxonomia, o gênero foi agrupado em oito seções e nove subseções, sendo esta a classificação atual (BISBY, 1970; BISBY, 1973; BYSBY; POLHILL,

1973). Bisby e Polhill (1973) apontam que o gênero pode ser dividido em duas partes, conforme a complexidade floral, sendo um grupo com espécies com especialização floral e o outro contendo espécies sem especialização das flores.

O grau de especialização floral é inferido a partir de caracteres morfológicos, como a forma do receptáculo, o grau de torção do bico da quilha, posição dos apêndices no estandarte, cálice bilabiado ou não e a forma e presença de pêlos no estilete (POLHILL, 1968; BISBY; POLHILL, 1973; POLHILL, 1982). Esta especialização pode estar relacionada com a eficiência na transferência do grão de pólen para o polinizador (POLHILL, 1982).

Bisby e Polhill (1973) sugeriram a divisão do gênero em dois subgêneros. O primeiro contendo as seções *Grandiflorae*, *Chrysocalycicae*, *Hedriocarpae* e *Geniculatae* e o segundo com as seções *Calycinae*, *Crotalaria* e *Dispermae*. Porém, esse tipo de classificação não é possível, devido a presença de espécies intermediárias fora da África, particularmente nas seções *Calycinae* e *Crotalaria*. Muitos destes grupos intermediários são resultados de uma evolução convergente, com um número de caracteres evoluindo várias vezes. (BISBY; POLHILL, 1973).

Cerca de metade do gênero *Crotalaria* possui flores não especializadas (POLHILL, 1968) tendo este grupo uma distribuição principalmente ao sul da África e anfiatlântica, com maior ocorrência na América do Sul (BISBY; POLHILL, 1973).

As principais aplicações agrícolas de espécies do gênero *Crotalaria* são como fontes de nitrogênio pela fixação biológica através da adubação verde, agente biológico no controle de nematóides, cobertura do solo para controle da erosão, produção de celulose, fibras têxteis, ornamentação e alimentação animal (MEDINA, 1959; POLHILL, 1982).

Além disso, há um grande interesse na composição química de espécies do gênero *Crotalaria*, que são particularmente ricas em alcalóides pirrolizidínicos (APs) (FLORES, 2004). Estes alcalóides podem atuar como antimicrobianos e em alguns insetos estimulam a ovoposição (CAMPO; SMEDLEY; EISNER, 2005). Outras substâncias de interesse da indústria farmacêutica são a crotaorixina, que inibe o crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum* (NARANDER et al., 2005), os ácidos crotálico e emarginélico, que apresentam atividade antiinflamatória e antihepatotóxica, respectivamente (AHMED; AL-HOWIRINY; MOSSA, 2006), e a lecitina extraída de sementes de *C. paulina*, que inibe o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (PANDO et al., 2004). Além do mais, um extrato obtido de *Crotalaria sessiflora* melhora a atividade antioxidante, a função imune, além de reduzir os efeitos colaterais no tratamento de câncer de intestino, auxiliando não apenas

no tratamento, como também na prevenção desse tipo de câncer (UNIV HOSEO ACADEMIC COOP FOUND, 2007).

2.2 A Citogenética do gênero *Crotalaria*

A maioria dos gêneros pertencentes à tribo Crotalariae possui um número básico de cromossomos $x=9$, no entanto, outros números básicos também têm sido propostos, como $x=7$, para os gêneros *Pearsonia* e *Rothia*, $x=12$ para *Anathrophyllum* e $x=8$ como o número básico de *Rafnia* e *Crotalaria* (GOLDBLATT, 1981).

Ao realizar uma revisão em relação à citogenética do gênero *Crotalaria*, observa-se que a maioria dos estudos citogenéticos realizados neste gênero estão restritos à contagem do número de cromossomos e à descrição do cariótipo de algumas espécies, utilizando-se coloração convencional de raízes tratadas ou não com inibidores do fuso mitótico (GUPTA; GUPTA, 1978a, 1978b; RAINA; VERMA, 1979; VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984; PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; TAPIA-PASTRANA, et al., 2005; ALMADA et al., 2006; FLORES et al., 2006).

Um dos trabalhos pioneiros em relação ao número básico de cromossomos do gênero foi realizado por Senn (1939 apud ATCHINSON, 1950), onde originalmente foi descrito que a maioria das espécies de *Crotalaria* possui $x=8$, e que somente algumas espécies possuem $x=7$. A contribuição principal deste trabalho foi a sugestão de um mecanismo para a redução do número básico de cromossomos de $x=8$ para $x=7$. Senn (1939 apud ATCHINSON, 1950) sugere que esta diminuição teria se originado por aneuploidia, ou por translocações envolvendo a perda de um centrômero, sem que houvesse perda de material genético.

Embora não se possa comprovar qual dos mecanismos seja o responsável pela origem do número básico de cromossomos $x=7$ em *Crotalaria*, certamente o mecanismo de translocação é o mais parcimonioso, por não envolver a perda de grande conteúdo gênico (STEBBINS, 1971). Além disso, este mecanismo de redução do número cromossômico por translocação e perda de um centrômero foi recentemente comprovado. Para demonstrar a origem do número básico de cromossomos de *Arabidopsis thaliana* ($x=5$) e outras espécies relacionadas ($x=6$ e $x=7$), Lysak, et al. (2006) desenvolveram um conjunto de sondas a partir de BACs (cromossomos artificiais de bactérias) que permitiu a pintura individual dos cromossomos de *A. thaliana*. A hibridação cruzada destas sondas com as demais espécies permitiu a identificação das translocações e dos

centrômeros perdidos durante o processo e este mecanismo foi descrito como o mais importante na evolução do número básico de cromossomos em Brassicaceae (LYSAK, et al., 2006), comprovando as suposições anteriormente feitas por Stebbins (1971).

Este mecanismo também havia sido proposto por Atchinson (1950) para explicar o número cromossômico de *C. incana* ($2n=2x=14$). Porém, o autor fez outras observações relevantes. Uma delas foi a constatação da presença de uma correlação entre o tamanho dos cromossomos (análise visual) e a posição botânica destas espécies de acordo com seu grau de especialização floral.

Outra observação feita por Atchinson (1950) mostrava que os cromossomos de *C. incana* ($2n=14$) eram maiores que os das espécies diplóides com $2n=16$ e que espécies poliplóides, como *C. pumila*, onde o número cromossômico dobra ($2n=4x=32$), o tamanho dos cromossomos fica mais reduzido.

Além disso, o autor infere, através dos padrões morfológicos e citológicos, que o gênero é ancestralmente tropical com um número diplóide de $2n=16$ (ATCHISON, 1950). Esta observação serviu de suporte para a teoria botânica que propõe a origem do gênero em uma região limitada no sul do continente africano (POLHILL, 1982).

O estabelecimento de grupos botânicos organizados de acordo com o grau de especialização floral concretizado por Polhill (1968), permitiu a Boulter et al. (1970) realizar um dos trabalhos mais importantes para a compreensão da citogenética do gênero.

Apesar de ser um trabalho relativamente simples, Boulter et al. (1970) relacionou os resultados citogenéticos obtidos para cada uma das espécies estudadas com as respectivas seções botânicas. Isso foi possível devido ao grande número de espécies analisadas, 57 espécies ao todo e devidamente classificadas por Polhill (1968). Um dos resultados foi a comprovação da predominância de espécies com $2n=16$ cromossomos, no entanto, não há qualquer menção deste ser o número cromossômico básico do gênero (BOULTER, et al. 1970).

A principal conclusão deste trabalho foi a comprovação de uma diminuição no tamanho dos cromossomos e que esta redução de tamanho está relacionada com o aumento da especialização floral, sendo que cromossomos maiores predominam nas seções Grandiflorae e Chrysocalycinae (particularmente subseção Incanae), considerados como grupos derivados e com menor especialização floral, enquanto cromossomos menores estão na seção Crotalaria (subseção Longirostres) e seção Dispermae, considerados grupos mais especializados (BOULTER, et al. 1970).

Gupta (1976) publica o único trabalho sobre o conteúdo de DNA em espécies de *Crotalaria*. Neste, o autor estima o conteúdo de DNA nuclear, a área nuclear e a massa seca nuclear de 13 espécies do gênero *Crotalaria*.

O conteúdo de DNA em *C. pallida* (seção Hedriocarpae) foi de 2.50 pg, enquanto em *C. retusa* (seção Crotalaria) foi de 1.95 pg, indicando perda de material genético com o ganho de especialização floral. Outra observação foi que espécies pertencentes a diferentes seções podem ter conteúdos similares de DNA e que as espécies pertencentes à mesma seção podem ter diferentes conteúdos de DNA (GUPTA, 1976). Além disso, estas variações na quantidade do conteúdo de DNA teriam um importante papel na evolução do gênero, porém ainda mais importante seria a variação qualitativa do DNA (GUPTA, 1976).

Posteriormente, Gupta e Gupta (1978a) estudando 27 espécies do gênero através de medidas de cromossomos mitóticos observaram uma variação de 15,2μm a 33,6μm no comprimento total do lote haplóide (CTLH), indicando uma considerável variação no conteúdo total da cromatina.

Comparando estes cromossomos mitóticos com cromossomos meióticos na fase de paquíteno (GUPTA; GUPTA, 1978a; 1978b) verificou-se que a maior parte das espécies tem cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, consequentemente cariótipos simétricos.

Além disso, os autores indicam que a seção Incanae seria derivada da seção Grandiflorae pelo aumento no tamanho dos cromossomos menores em relação aos maiores acompanhado da redução do número cromossômico de $2n=16$ para $2n=14$. A partir desta observação, os autores sugerem que cariótipos assimétricos deram origem aos simétricos, resultado de uma derivação secundária (GUPTA; GUPTA, 1978a; 1978b).

De maneira geral os autores concluem que se houveram algumas mudanças estruturais importantes na evolução dentro do gênero *Crotalaria*, estas não modificaram o cariótipo de maneira significativa. Assim, a derivação e a especiação do gênero são, provavelmente, resultadas de mudanças em genes individuais ou complexos gênicos através de mutações ou recombinações genéticas (GUPTA; GUPTA, 1978a; 1978b). Estas conclusões corroboram com a idéia de Gupta (1976), de que as variações qualitativas teriam uma importância maior quando comparadas com as variações quantitativas no conteúdo de DNA para explicar a evolução o gênero.

Raina e Verma (1979) estudando vinte espécies de *Crotalaria* observaram que o par de cromossomos maior é 1,5 vezes maior quando comparado ao menor par do complemento, e que a

constricção secundária aparece apenas neste primeiro par de cromossomos. A posição da constricção secundária alterava entre as espécies e poderia ser organizada em três tipos: com a constricção secundária próxima ao centrômero, um pouco mais afastada do centrômero e por último, próxima a metade do braço cromossômico. Raina e Verma (1979) sugerem que estas mudanças poderiam ser resultados de deleções, translocações desiguais ou inversões.

Além disso, os autores sugerem para as espécies que possuem a constricção primária separada por um pequeno segmento de cromatina da constricção secundária, que durante a evolução ocorreram perdas desta cromatina, posicionando as duas constricções praticamente no mesmo loco (RAINA; VERMA, 1979).

Ainda, os autores descrevem o gênero como tendo uma grande estabilidade dos cromossomos, em relação à morfologia, ao tamanho e à simetria. Esta característica seria um indício de que a especiação não estaria relacionada com a diferenciação cromossômica (RAINA; VERMA, 1979).

Verma e Raina (1980) estudando a meiose das espécies do trabalho anterior verificaram a formação natural de oito bivalentes. No entanto, algumas anormalidades foram descritas como a formação de univalentes para a espécie *C. lanceolata*, ou ainda a formação de multivalente para as espécies *C. lanceolata* e *C. intermedia*. Estas anormalidades poderiam ser consequências de várias alterações cromossômicas estruturais.

Os autores também observaram a formação de pontes com ou sem fragmentos nas espécies *C. lanceolata* e *C. retusa*, indicando para estas espécies, heterozigose para inversões paracêntricas (VERMA; RAINA, 1980). Mesmo assim, os autores concluem que a derivação e a especiação do gênero na natureza, provavelmente ocorreram através de mutações gênicas no nível diplóide (VERMA; RAINA, 1980).

Verma, Kesavacharyulu e Raina (1984) deram continuidade ao estudo mitótico realizado por Raina e Verma (1979) e analisaram outras 19 espécies de *Crotalaria*. Os resultados foram semelhantes ao anterior, como as três posições da constricção secundária e a diferença de 1,5 vezes entre o maior e menor cromossomo (RAINA; VERMA, 1979; VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984).

Os autores discutem sobre a origem do número $x=7$ para a seção *Incanae*, como derivada da seção *Macrostachyae*, hipótese primeiramente apresentada por Atchinson (1950) ou derivado da seção *Grandiflorae*, conforme proposto por Gupta e Gupta (1978a; 1978b) (VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984). Apesar de discutir as duas hipóteses, os autores

concluem que a seção *Grandiflorae* apresenta uma maior similaridade com a seção *Incanae*, apoiando a teoria proposta por Gupta e Gupta (1978a; 1978b) (VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984).

Para algumas espécies, como *C. ochroleuca*, foi observado apenas um cromossomo nucleolar, sendo considerado resultado de anfiplastia, ou seja, devido à origem híbrida, o organizador nucleolar mais fraco é suprimido (VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984). Porém, como já observado por Gupta (1976), cruzamentos interespecíficos no gênero *Crotalaria* são pouco prováveis de ocorrer.

Em relação aos poliplóides, observou-se uma tendência na redução do tamanho dos cromossomos, principalmente quando se compara as espécies tetraplóides com as espécies diplóides (VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984). Esta diminuição seria atribuída à adaptação dos poliplóides e a manutenção de um balanço núcleo-citoplasma, próximo ao nível diplóide. No entanto, estes dados não foram comparados com os trabalhos anteriores, por causa das diferentes técnicas de preparação das lâminas e de pré-tratamentos com inibidores do fuso mitótico utilizados por cada autor, além das influências ambientais. Além disso, os autores sugerem que a poliploidia não apresenta um papel significativo na especiação do gênero, devido à rara ocorrência de poliplóides em *Crotalaria* (VERMA; KESAVACHARYULU; RAINA, 1984), o que não é verdade, pois Windler (1974) demonstrou que a maioria das espécies endêmicas do continente Americano são tetraplóides e predominantemente pertencem a seção *Calycinae*.

Corroborando com as análises realizadas por Windler (1974), Palomino e Vázquez (1991) em estudo sobre populações mexicanas de espécies de *Crotalaria* observaram que a poliploidia seria um mecanismo importante para a especiação das espécies americanas, uma vez que espécies com $2n=32$ foram descritas em pelo menos 20 espécies do novo mundo. No entanto, em espécies asiáticas e africanas, este evento não teria importância, já que apenas uma espécie foi relatada como poliplóide (PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991).

Os autores encontraram dois citótipos para *C. incana* e sugerem que estas variações cariotípicas possam ser resultadas de rearranjos estruturais, principalmente translocações. Variações cariotípicas podem estar relacionadas ao processo de especiação, pois distintos citótipos podem acarretar em alterações morfológicas de valor evolucionário (PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991).

Oliveira e Aguiar-Perecin (1999) estudando 11 espécies de *Crotalaria*, em preparações com um padrão homogêneo de condensação dos cromossomos, compararam e analisaram

morfometricamente os cariótipos e mostraram a predominância de cromossomos com centrômero na posição mediana, regiões organizadoras do nucléolo no primeiro par de cromossomos e um decréscimo contínuo do tamanho dos mesmos, confirmando observações anteriores.

Observaram também, que a seção Calycinae apresenta os maiores índices de simetria entre os cariótipos, e na seção Crotalaria foi possível a diferenciação das duas subseções, Crotalaria e Longirostres, com base no tamanho dos cromossomos e no índice de assimetria. Estes dados sugerem um aumento do índice de assimetria e diminuição do tamanho dos cromossomos nas seções mais especializadas. Além disso, Oliveira e Aguiar-Perecin (1999) observaram a ocorrência de uma maior similaridade entre cariótipos de espécies relacionadas dentro das respectivas seções e subseções botânicas.

Em *C. incana* foi observado que o comprimento do lote haplóide é semelhante ao das espécies com $2n=16$, apesar de ter um par de cromossomos a menos. Além disso, uma outra hipótese sobre a origem desta espécie foi lançada, a de que *C. incana* teria se originado a partir de espécies da própria seção Chrysocalycinae (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN; 1999). Esta hipótese contradiz as demais anteriormente citadas, porém é mais coerente a ocorrência de acontecimentos dentro de uma mesma seção, ao invés de eventos que ocorram em um grupo, resultando em uma espécie com semelhanças a um terceiro grupo.

As autoras comentam que aproximadamente 7% das espécies analisadas são poliplóides, principalmente entre as espécies americanas pertencentes à seção Calycinae, sugerindo para este evento uma origem recente, além de um importante papel na diversificação do gênero nos centros secundários, concordado com a idéia de Palomino e Vázquez (1991) (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN; 1999).

Assim como em estudos anteriores, Oliveira e Aguiar-Perecin (1999) observaram uma redução no tamanho dos cromossomos das espécies poliplóides, em relação as diplóides. Esta redução parece ser a condição necessária para sobrevivência e estabelecimento dos poliplóides na natureza, atuando de maneira correta para a eliminação do excesso de material genético, corroborando com a idéia de Verma, Kesavacharyulu e Raina (1984), primeiramente proposta.

A partir do estudo de Oliveira e Aguiar-Perecin (1999), Mondin (2003) utilizou técnicas de bandamento cromossômico e mapeamento físico de rDNA 45S e 5S por hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH), para estudar as mesmas espécies. O autor pode constatar que espécies com maior grau de especialização floral possuem blocos heterocromáticos pericentroméricos ricos em GC (CMA^+ - CMA/DA^-), sentença entre as posições dos genes ribossomais e uma

particular diferenciação entre as heterocromatinas pericentroméricas daquelas adjacentes à constrição secundária quando corada com a combinação cromomicina A₃/ distamicina. Enquanto, *C. incana*, pertencente a uma seção com menor grau de especialização floral, não possui regiões heterocromáticas pericentroméricas ricas em GC; há uma perda de sintenia entre os genes ribossomais, exceto para o rDNA 45S do cromossomo 1, o qual deve ter uma origem muito antiga no gênero; e possui pequenas regiões ricas em AT em posições intersticiais e terminais dos cromossomos.

Mondin (2003) descreve que a alteração do tamanho dos cromossomos é devida em parte à diminuição do tamanho dos blocos heterocromáticos, observado entre as espécies de flores especializadas e a eliminação de seqüências de DNA durante o processo evolutivo. Esta última observação pode ser feita comparando-se espécies poliplóides da seção Calycinae, que nunca apresentavam o dobro de sítios de rDNA 45S e 5S mapeado via FISH, com a provável espécie diplóide ancestral. Desta forma o autor pôde concluir que alguns locos de genes ribossomais foram eliminados durante o processo e outros estavam diminuindo de tamanho com tendência a eliminações dos mesmos, em um processo de diploidização (revisão em WENDEL, 2000; LEITCH; BENNETT, 2004).

Estes resultados, no entanto, apenas indicam que, provavelmente, as espécies de flores não especializadas, teriam genomas parecidos com o de *C. incana*, uma vez que as espécies de seções com flores especializadas apresentaram algumas regiões cromossômicas bem conservadas (MONDIN, 2003) e por espécies de uma mesma seção botânica compartilharem semelhanças de características morfométricas (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999).

Outro estudo realizado com populações mexicanas de *C. incana* mostrou, através de prometáfases, alguns cromossomos com as partes terminais não condensadas, semelhantes às constrições secundárias (TAPIA-PASTRANA, et al. 2005). Apesar das evidências apontarem para um novo citótipo, os autores preferiram não interpretar como tal, pois embora estas regiões se assemelhem as constrições secundárias, elas não apresentavam RONS ativas, nem variações do número de nucléolos, podendo ser o resultado do menor grau de contração da cromatina na fase mitótica analisada (TAPIA-PASTRANA, et al. 2005), embora Mondin (2003) tenha mapeado o rDNA 45S em posições terminais de alguns cromossomos desta espécie.

Almada, Daviña e Seijo (2006) analisando espécies de *Crotalaria* da América do Sul chegaram a importantes resultados. O primeiro foi a descrição pela primeira vez de uma espécie octaplóide, a *C. tweediana*, com $2n=8x=64$ cromossomos, sendo o maior nível de ploidia

detectado para o gênero. Outra observação é em relação à redução do número cromossômico de $x=8$ para $x=7$, onde os autores apóiam a hipótese de uma redução no número cromossômico, sem perda significativa de material genético. Esta afirmação foi sustentada observando que a média do comprimento cromossômico de *C. incana* era similar ou mesmo superior aos das espécies com $x=8$ (ALMADA; DAVIÑA; SEIJO, 2006).

Os autores também relatam que 11% das espécies são poliplóides, 3% a mais que a revisão realizada por Oliveira e Aguiar-Perecin (1999). Devido a isso, os autores inferem que a poliploidia deve ser considerada, como um importante evento na evolução do gênero, principalmente das espécies americanas da seção Calycinae. A descrição de uma espécie octaplóide, confirmou a importância dos poliplóides na evolução do gênero (ALMADA; DAVIÑA; SEIJO, 2006).

Ao contrário do que a maioria dos autores sugere os resultados apresentados por Almada, Daviña e Seijo (2006) mostraram a não uniformidade dos cariótipos, podendo esta variabilidade ser observada através do número básico cromossômico, pelo nível de ploidia e posição da constrição secundária. Além disso, os resultados deste trabalho mostram seções ancestrais possuindo cariótipos mais assimétricos que as seções derivadas, contrariando estudos anteriores, que consideravam as seções mais especializadas como aquelas de cariótipo mais assimétrico (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999), entretanto, o rigor dos pré-tratamentos e da seleção das metáfases deve ser levado em consideração nestes casos.

Simultaneamente, foi realizada uma análise do tamanho do pólen, do comprimento das células guardas estomacais e do peso de sementes, relacionando com o nível de ploidia das espécies. O tamanho do pólen foi maior em tetraplóides do que em diplóides; o tamanho das células guardas aumentou dos diplóides para tetraplóides e diminuiu na espécie octaplóide e nenhuma relação foi encontrada entre o peso da semente e o nível de ploidia. Estes resultados indicam que a massa de DNA afeta o tamanho celular (ALMADA; DAVIÑA; SEIJO, 2006).

No mesmo ano, foi publicado um trabalho descrevendo o número de cromossomos de espécies brasileiras de *Crotalaria*, demonstrando a tendência para a ocorrência de espécies poliplóides na América, confirmando trabalhos anteriores (FLORES, et al., 2006). As autoras enfatizam a importância da poliploidia em espécies do Novo Mundo e acrescentam que o Novo Mundo foi à última área a ser colonizada pelas espécies da seção Calycinae, acompanhadas de um aumento na ploidia (FLORES, et al., 2006).

O principal relato deste estudo foi de um novo número cromossômico para *C. tweediana* com $2n=54$. As autoras sugerem duas interpretações: a primeira que este número possa ser consequência de aneuploidia com $7x-2$, onde $x=8$, porém espécies com níveis de ploidia ímpar apresentam problemas de fertilidade ou se reproduzem sexuadamente. A segunda, e a mais plausível para as autoras, é que este número seria um hexaplóide de $x=9$, relatando um novo número básico para o gênero (FLORES, et al., 2006). Entretanto, esta mesma espécie foi descrita com $2n=8x=64$ cromossomos, por Almada, Daviña e Seijo (2006), em uma população da Argentina, o que indica que o novo número encontrado seja um derivado restrito a uma determinada população. Para se entender melhor este fenômeno, outras populações de *C. tweediana* coletadas no Brasil estão sendo estudadas no departamento de Genética da ESALQ/USP.

Exceto pelo estudo realizado por Mondin (2003), a maioria dos trabalhos realizados no gênero estão limitados à contagem do número cromossômico, sem o emprego de técnicas mais avançadas. No entanto Mondin, Santos-Serejo e Aguiar-Perecin (2007) realizaram uma caracterização mais minuciosa de *C. juncea* através de técnicas mais avançadas. Utilizando técnicas de bandamentos fluorescentes, coloração com prata e hibridação molecular *in situ* das sondas de rDNA 45S e 5S demonstraram que a contração secundária está presente apenas no par 1, confirmando estudos anteriores, porém observaram um sítio de rDNA 45S adicional localizado no braço longo do cromossomo 4. Este sítio menor aparece em algumas metáfases impregnado com prata, indicando uma possível atividade nucleolar em algumas células, ou em estágios iniciais do ciclo celular (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

Apenas um loci foi observado para rDNA 5S, posicionado na região proximal do braço longo do cromossomo 1. A coloração com fluorocromos revelou que os rDNAs são CMA^+ e CMA/DA^+ , enquanto as heterocromatinas pericentroméricas são CMA^+ e CMA/DA^- o que sugere diferenciação no conteúdo de GC ou nos resíduos de AT. Estes padrões não são observados em *C. incana* (seção Chrysocalycinae; subseção Incanae) com flores não especializadas (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

Estes resultados indicam que, apesar das espécies do gênero *Crotalaria* possuírem cariótipos morfologicamente semelhantes entre si, as diferenças encontradas entre os marcadores cromossômicos das seções botânicas com espécies especializadas e das seções botânicas com espécies sem especialização floral indicam uma provável diferenciação na organização cromossômica entre tais grupos.

2.3 Os genes ribossomais e as regiões organizadoras do nucléolo (RON) como marcadores para estudo da evolução cariotípica

Os genes ribossomais 18S-5.8S-26S e 5S formam uma família gênica moderadamente repetitiva que apresenta posições relativamente conservadas nos cromossomos, o que torna estas regiões importantes marcadores para o estudo da evolução dos cromossomos e dos processos envolvidos nas suas alterações. Além disso, o arranjo dos genes 18S-5.8S-26S, abreviado rDNA 45S, é o responsável pela organização do nucléolo (revisão em PIKAARD, 1999, 2000). Entretanto, estes genes que formam longos arranjos em *tandem* em uma determinada região cromossômica, podem ocupar diferentes locos no genoma, e não necessariamente serem todos expressos. Uma expressão citológica clara de que um destes arranjos foi ativo durante a interfase organizando o nucléolo, é a presença de constrições secundárias nos cromossomos (ver NAVASHIN, 1927; MCCLINTOCK, 1934), embora recentemente tenha sido demonstrado a ocorrência de expressão de genes ribossomais, sem que houvesse necessariamente a formação de uma constrição secundária (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

O conhecimento da relação entre a expressão destes genes com estruturas nucleares e cromossômicas, permitiu em primeira instância o estudo das dominâncias nucleolares (NAVASHIN, 1927), que até hoje continua sendo um modelo para o estudo do controle da expressão gênica e dos mecanismos epigenéticos envolvidos neste controle (PIKAARD, 1999 e 2000; LAWRENCE et al., 2004).

Os estudos de Navashin (1927) no início do século passado, utilizando híbridos interespecíficos e aloploplóides, foi o passo inicial para a utilização das regiões organizadoras do nucléolo (constrições secundárias) como marcadores no estudo da evolução dos cariótipos. O uso das regiões organizadoras do nucléolo (RON) como marcadores cromossômicos, implica necessariamente na expressão destas regiões na interfase anterior e a formação de constrição secundária na metáfase. Portanto, podemos dizer que os estudos citológicos através de coloração convencional utilizando-se RON como marcadores cromossômicos, é um estudo de regiões ativas do genoma (revisão em SWANSON, 1981; STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992; SINGH, 2002). Exemplos destes estudos, para o entendimento da evolução cariotípica de plantas, podem ser dados para o gênero *Capsicum* (BERTÃO, 1993), *Stylosanthes* (VIEIRA; AGUIAR-PERECIN; MARTINS, 1993), *Crotalaria* (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999), *Tulbaghia*

(VOSA, 2000) e *Eriospermum* (VOSA; PERRY, 1999), *Mikania* (RUAS; AGUIAR-PERECIN, 1997). Ressalta-se, no entanto, que estes exemplos são apenas de casos mais próximos, uma vez que a lista de gêneros estudados por este método é extensa.

Durante os anos de 1970 e 1980 com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento da hibridação molecular *in situ*, a utilização do rDNA 45S tornou-se dissiminada por duas razões principais: os arranjos completos de milho e trigo (revisão em FLAVELL, 1989, MASCIA et al., 1981) já haviam sido isolados e clonados e a verificação de que estes genes eram altamente conservados entre as espécies de plantas, de modo que novos isolamentos não eram necessários e os experimentos de hibridação *in situ* cruzada eram reproduzíveis, conservados e refletiam exatamente os locos com arranjos de genes ribossomais (HESLOP-HARRISON, 2000). Do mesmo modo o isolamento e o sequenciamento do rDNA 5S de trigo (GERLACH; DYER, 1980), tabaco (VENKATESWARLU; LEE; NAZAR, 1991) e soja (GOTTLOB-MCHUGH et al., 1990) permitiram o uso deste gene ribossomal como marcador, desde que a sequência espaçadora (entre 350-550pb) fosse eliminada por ser altamente polimórfica e utiliza-se apenas o arranjo do gene (~140pb) que é altamente conservado e permite a hibridação *in situ* cruzada, ainda que em experimentos com alta estrringência.

Alternativamente neste período, quando não era possível a utilização da hibridação molecular *in situ*, a utilização da metodologia de precipitação de nitrato de prata, desenvolvido por Howell e Black (1980), era a forma mais eficiente e barata de se localizar sítios de rDNA 45S ativos, mesmo que estes não formassem constrições secundárias.

Utilizando esta metodologia de precipitação de prata, Schubert (1984) propôs que possivelmente o rDNA 45S tinha algum tipo de mobilidade, tal como os elementos de transposição. Entretanto, seus resultados com nitrato de prata não eram conclusivos, pois de forma alguma era provado a presença de rDNA 45S nestas novas posições após o evento de transposição, já que o nitrato de prata apresenta especificidade a outras proteínas e não somente às nucleolares. Posteriormente, Schubert e Wobus (1985) através da hibridação molecular *in situ* com o rDNA 45S, comprovaram a presença desta sequência nas posições previamente identificadas como ativas pelo nitrato de prata e comprovaram que este arranjo tinha alguma capacidade de mudar de posição no genoma.

Recentemente, Raskina, Belyayev e Nevo (2004a, 2004b) demonstraram que tanto o rDNA 45S, quanto o rDNA 5S podem estar associados com elementos de transposição do tipo En/Spm. Os autores demonstraram através de hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) que os

elementos de transposição quando ativos carregam fragmentos dos rDNAs, que no novo sítio de inserção se amplificam e dão origem a um novo loco. Um outro grande feito destes trabalhos foi demonstrar pela primeira vez que este mecanismo poderia gerar uma nova espécie. O estudo de duas espécies de *Aegilops* em duas populações a menos de 30 metros de distância, que não se misturavam e que ocupavam tipos de solos bem distintos, demonstrou que a espécie *Aegilops speltoides* era altamente instável com relação à posição dos rDNA 45S e 5S, e que esta instabilidade por inúmeras vezes reproduzia fielmente as posições dos rDNA 45S e 5S de *Aegilops sharonensis*. Os autores ainda detectaram que estas alterações dos rDNAs produziam variantes morfológicas de *A. speltoides* que eram idênticas as de *A. sharonensis*. Foi proposto então, que durante o período quaternário, quando aquela região sofreu as maiores alterações geológicas, o tipo de solo surgido favoreceu a fixação dos locos rDNA 45S e 5S do tipo de *Ae. sharonensis* e deram origem a uma nova espécie.

Desde os trabalhos de Navashin com dominância nucleolar, acreditava-se que também nos poliplóides o rDNA apresentava uma dinâmica de reorganização, que posteriormente foi demonstrada como sendo o resultado de transposição, deleção e eliminação de loci e também do controle epigenético (revisão em Wendel, 2000).

Em híbridos somáticos de *Passiflora*, Cuco et al. (2005) descreveram que um dos híbridos apresentava número de locos de rDNA 45S maior que o esperado. Após uma análise detalhada das posições do rDNA 45S das espécies parentais, os autores puderam concluir que um loco menor na extremidade de um dos cromossomos, tratava-se de um novo loco resultado de um evento de transposição. Por outro lado, Mondin (2003) estudando poliplóides do gênero *Crotalaria*, através de FISH dos rDNA 45S e 5S, observou que um dos poliplóides possuía número idêntico de locos de rDNA ao da espécie diplóide (provável ancestral) e que uma outra espécie apresentava um número intermediário entre o que seria esperado e o da espécie diplóide. Neste caso o autor pode inferir que durante a evolução das espécies poliplóides, estas sequências de rDNA foram eliminadas, ao ponto de uma delas restaurar o estado diplóide com relação ao número de locos de genes ribossomais. Fenômeno semelhante havia sido descrito previamente no gênero *Scilla* durante a evolução dos poliplóides (VAUGHAN, et al., 1993).

No estudo da evolução cariotípica de espécies diplóides, a detecção da ocorrência de uma alteração cromossômica de uma espécie em relação à outra, somente era possível através de um cruzamento interespecífico e a observação do pareamento cromossômico durante a meiose (STEBBINS, 1971). Este tipo de procedimento limitava muito as inferências sobre os

mecanismos envolvidos na evolução cromossômica, principalmente de espécies distantes. A hibridação molecular *in situ* fluorescente dos rDNA 45S e 5S mostrou ser uma das mais promissoras ferramentas no entendimento da evolução cariotípica e elucidou estas questões em um grande número de gêneros (revisão em HESLOP-HARRISON, 2000).

Um caso típico é o do gênero *Hypochaeris* (Asteraceae), que tem origem européia (cariótipos simétricos modais) e um centro de diversidade na América do Sul (cariótipos assimétricos bimodais) (STEBBINS, 1971). Embora houvesse suspeitas sobre o envolvimento de alterações cromossômicas no processo de especiação, estas nunca haviam sido demonstradas. Ruas et al. (2005) através de uma análise filogenética com marcadores de RAPD, pode agrupar espécies de cariótipos semelhantes dentro do mesmo clado. A hibridação *in situ* (FISH) com os genes ribossomais demonstrou que a maior diferença entre os clados era devido a inversões cromossômicas nos cromossomos que continham os locos ribossomais. Ressalta-se que neste caso os genes ribossomais não estão envolvidos diretamente nas alterações, mas serviram apenas como marcadores para localizar os pontos de quebra.

Outro caso elucidativo quanto aos mecanismos de evolução cromossômica ocorreu no gênero *Phaseolus*. Moscone et al. (1999) estudando três espécies de *Phaseolus* e duas cultivares européias, através de FISH de rDNA 45S e 5S, propôs que o gênero evoluiu através de duplicações dos locos ribossomais e de inversões nas posições destes locos. Entretanto, Pedrosa-Harand et al. (2006) estudando feijões Andinos e Mesoamericanos, com a mesma técnica, sugeriu que as variações no número de locos e o maior evento de amplificação dos genes ribossomais ocorreram na linhagem Andina após sua separação da linhagem Mesoamericana.

Em gêneros com filogenia e botânica sistemática bem estabelecidas, tal como o gênero *Crotalaria*, já descrito anteriormente, os padrões de distribuição dos locos de rDNA 45S e 5S são bem conservados e a sintenia destes locos permitem inferir sobre os eventos que ocorreram durante a evolução. É o caso dos gêneros *Vicia* (RAINA et al., 2001; NAVRÁTILOVÁ; NEUMANN; MACAS, 2003) e *Lathyrus* (ALI; MEISTER; SCHUBERT, 2000) onde as espécies estão agrupadas em seções e subseções botânicas de acordo com os estudos morfológicos e de filogenia molecular; e a posição dos locos de rDNA e suas alterações acompanham estes agrupamentos.

Portanto, o mapeamento físico, através de FISH de DNAs ribossômicos 45S e 5S como marcadores cromossômicos, é uma ferramenta importante para a compreensão da evolução dos

genomas e poderá contribuir significativamente para o entendimento das relações entre as espécies e a evolução no gênero *Crotalaria*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As espécies estudadas no presente trabalho estão descritas na tabela 1. Todas as espécies pertencem à seção *Hedriocarpae*, subseção *Macrostachyae*, sendo utilizados os acessos pertencentes ao banco de sementes do Departamento de Genética - ESALQ/USP. Estas espécies estavam classificadas de acordo com a tabela 1, conforme as amostras de sementes recebidas dos locais de origem, as exicatas foram confeccionadas e reclassificadas pela Dra. Andréia Silva Flores por comparação com o material depositado no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP e a classificação foi correspondente àquela feita por Lewis (1987) com exicatas depositadas no Herbário Alexandre Leal Costa – Bahia (ALCB) do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

Crotalaria pallida, *C. mucronata* e *C. striata* foram primeiramente identificadas como espécies diferentes, porém a partir de estudos mais detalhados, constatou-se que *C. striata* e *C. mucronata* são espécies sinônimas de *C. pallida*. Portanto, neste trabalho, onde se lê *C. striata* e *C. mucronata* denota diferentes populações de *C. pallida*.

Todas as espécies são encontradas em beiras de estradas e terrenos baldios (FLORES, 2004), sendo de origem Africana. No Brasil, são conhecidas pelos nomes populares de chocalho, xique-xique, guizo-de-cascavel, e são encontradas em todas as suas regiões, exceto *C. ochroleuca* que ocorre apenas nos estados de São Paulo e Paraná (FLORES, 2004).

Tabela 1 – Espécies de *Crotalaria* da seção *Hedriocarpae*, subseção *Macrostachyae* utilizadas nas análises citológicas

Espécies	Local de Coleta	Local de Origem	Código ESALQ
<i>C. lanceolata</i>	Santa Rita – São Paulo BR 116 (Km 114)	Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP	CL-3
<i>C. ochroleuca</i>	Indeterminado	Piracicaba, ESALQ – SP	COC-1
<i>C. pallida</i>	Rio Bonito – RJ	Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP	CPA-1
<i>C. mucronata</i> *	Indeterminado	Piracicaba, ESALQ – SP	CM-1
<i>C. striata</i> *	Indeterminado	Piracicaba, ESALQ – SP	CSR-1

* espécies sinônimas de *C. pallida*.

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação

As sementes foram escarificadas quimicamente com ácido sulfúrico puro, para germinarem, seguindo as etapas abaixo:

As sementes foram colocadas em ácido sulfúrico puro durante 15 minutos. Terminado este tempo, o ácido foi lavado cuidadosamente em água corrente, até que toda substância fosse eliminada. As sementes lavadas foram secas em papel de filtro por 12 horas, e após este período de secagem, as sementes foram embebidas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido, até o inchaço das sementes. Após esta embebição as sementes foram semeadas em *Sphagnum* umedecido sob temperatura controlada de 28 a 30°C.

Depois de aproximadamente 18 horas, as raízes alcançaram o tamanho entre 1 e 3 cm, adequado para coleta e realização do pré-tratamento.

3.2.2 Pré-tratamento de raízes com inibidores do fuso mitótico

Os materiais coletados foram pré-tratados com uma solução hidroxiquinolina a 300 ppm + cicloheximida a 6,25 ppm por 1 hora e 30 minutos, conforme metodologia realizada por Cuco et al. (2003). Este pré-tratamento permite a obtenção de cromossomos em prometáfase e metáfase com nitidez de sua morfologia.

As raízes pré-tratadas foram fixadas por 24 horas em solução de Carnoy (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético). As raízes destinadas à coloração convencional pelo método de Feulgen, foram transferidas para uma solução de álcool a 70%, após a fixação; as destinadas a coloração com fluorocromos e hibridação molecular *in situ* (FISH) foram conservadas no fixador. Ambos os materiais foram conservados em congelador a -4°C (MONDIN; DOCHA NETO, 2006).

3.2.3 Métodos de preparações de lâminas

As raízes fixadas foram retiradas do congelador e ao atingirem a temperatura ambiente foram lavadas rapidamente em tampão citrato (citrato trissódico mais ácido cítrico, 0,01M, pH 4,6) e a seguir colocadas em microtubos contendo solução enzimática de celulase a 2%

(concentração final: 9,2 units mL⁻¹) mais pectinase a 0,3% (concentração final: 14,7 units mL⁻¹), pré-aquecidas a 37 °C e mantidas a esta temperatura, por 40 minutos. Em seguida, as pontas de raízes foram transferidas para uma placa de Petri contendo tampão citrato frio, mantida sobre um bloco de gelo. Cada raiz utilizada para uma preparação foi colocada em uma solução de ácido acético a 60% por um tempo variável de 3 a 5 minutos. Após este período a raiz foi retirada com pipeta Pasteur e colocada sobre a lâmina, sendo sua ponta esmagada cuidadosamente com uma pinça fina. O material foi coberto com lamínula, esmagado entre papel filtro para remover o excesso de ácido acético e permitir o espalhamento dos cromossomos. Após este procedimento, observou a lâmina em microscópio de contraste de fase e as melhores lâminas foram selecionadas e tiveram suas lamínulas removidas em nitrogênio líquido e secas ao ar.

As lâminas secas foram conservadas em cubas altas com sílica gel para evitar hidratação e mantidas a -20°C.

3.2.4 Coloração pelo método de Feulgen

As raízes conservadas em álcool a 70% foram retiradas do congelador para atingirem temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas por duas vezes em água destilada por 5 minutos, e então hidrolisadas em uma solução pré-aquecida de ácido clorídrico 1N por 8 minutos a 60 °C. As raízes hidrolisadas foram novamente lavadas por duas vezes em água destilada por 5 minutos. Posteriormente, em uma câmara escura, foi realizada a reação com reativo de Schiff, por 45 minutos e a seguir as raízes foram lavadas em água corrente em placas de Petri.

As melhores lâminas foram montadas permanentes com bálsamo do Canadá.

3.2.5 Coloração com fluorocromos

A coloração com fluorocromos adotou a metodologia descrita por Friebe et al. (1996) com algumas modificações.

3.2.5.1 Coloração com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol)

Após secagem das lâminas mantidas em freezer, sobre a lâmina foram aplicados 25 µl de uma solução de DAPI diluída em tampão de McIlvaine (pH 7,0) na concentração de 0,2

µg/ml, coberta com lamínula de parafilme e mantida no escuro para coloração durante 30 minutos.

Posteriormente, a lamínula foi removida e a lâmina rapidamente lavada em água deionizada, e colocada para secagem ao ar. A seguir, a lâmina foi montada com 5 µl de vectashield H-1000. As lâminas foram guardadas no escuro na geladeira de 10 °C a 20 °C, para estabilização dos corantes, antes de serem observadas.

3.2.5.2 Coloração com DAPI/AMD (4'-6'-diamidino-2-fenilindol/Actinomicina D)

As lâminas foram retiradas do freezer a -20 °C e deixadas para atingirem a temperatura ambiente. A seguir foram aplicados 25 µl de uma solução de DAPI diluída em tampão de McIlvaine (pH 7,0) na concentração de 0,2 µg/ml, sendo coberta com lamínula de parafilme e mantida no escuro para coloração durante 30 minutos. Após tal período, a lamínula foi retirada e a lâmina lavada rapidamente em água deionizada, e seca ao ar. Na lâmina seca foram aplicados 25 µl de uma solução de actinomicina D (AMD) diluída em tampão fosfato (pH 7,0) contendo 1 mM de EDTA, na concentração de 0,2 mg/ml, sendo coberta com lamínula de parafilme e mantida no escuro durante 20 minutos. Novamente, foi retirada a lamínula e a lâmina foi lavada em água deionizada e colocada para secar ao ar no escuro. A lâmina seca foi montada com 5 µl de vectashield H-1000. Antes de serem observadas, as lâminas foram guardadas no escuro em temperatura ambiente para estabilização dos corantes.

3.2.5.3 Coloração com CMA (Cromomicina A₃)

Após secagem das lâminas foram aplicados 25 µl de uma solução de CMA diluída em tampão de McIlvaine (pH 7,0) contendo MgCl₂ 5 mM, na concentração de 0,5 µg/ml, sendo coberta com lamínula de parafilme e mantida no escuro durante 2 horas. A seguir a lamínula foi removida e a lâmina lavada rapidamente em água deionizada, e colocada para secar ao ar no escuro. A lâmina seca foi montada com 5 µl de vectashield H-1000. Antes de serem observadas as lâminas foram deixadas no escuro em temperatura ambiente para estabilização dos corantes.

3.2.5.4 Coloração com CMA/DA (Cromomicina A₃/Distamicina)

Posterior a secagem das lâminas foram aplicados 25 µl de uma solução de CMA diluída em tampão de McIlvaine (pH 7,0) contendo MgCl₂ 5 mM, na concentração de 0,5 µg/ml, que foi coberta com lamínula de parafilme e mantida no escuro durante 2 horas. A seguir a lamínula foi retirada e a lâmina lavada rapidamente em água deionizada, e colocada para secar ao ar no escuro. Depois de seca na lâmina foram aplicados 25 µl de uma solução de DA diluída em tampão de McIlvaine (pH 7,0) na concentração de 0,2 mg/ml, coberta então com lamínula de parafilme e mantida no escuro por 10 minutos. Novamente, a lamínula foi retirada e a lâmina foi lavada em água deionizada e posta para secar ao ar. A lâmina seca foi montada com 5 µl de vectashield H-1000. Antes de serem observadas as lâminas foram deixadas no escuro em temperatura ambiente para estabilização dos corantes.

3.2.6 Hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH)

3.2.6.1 Sondas

Foram utilizadas como sondas a sequência de rDNA 18S-5.8S-25S (unidade de 9,1 kb, que será mencionada como rDNA 45S) de milho, clonada no plasmídeo pUC8 no sítio Eco RI, cordialmente cedida pelo Dr. R. L. Phillips (University of Minesota, EUA) e o produto da reação de PCR que amplificou fragmentos do gene e espaçadores do rDNA de 5S de *Crotalaria* (MONDIN, 2003).

3.2.6.2 Extração do DNA genômico total de espécies de *Crotalaria*

A extração de DNA genômico total foi realizada utilizando-se a espécie *C. striata* pertencente à seção Hedriocarpae. A extração seguiu o protocolo descrito pelo fabricante, para isolamento de DNA de plantas do KIT DNEASY (Qiagen).

As amostras de DNA resultantes da extração foram utilizadas para amplificação do rDNA de 5S a partir de uma reação de PCR, sendo o produto utilizado como sondas para o mapeamento físico deste loco nos cromossomos através de FISH.

3.2.6.3 Amplificação do gene de RNA ribossômico 5S

Os primers indicados abaixo (sintetizados pela life Technologies) foram utilizados para amplificar a sequência de rDNA de 5S, através de uma reação de PCR, empregando como molde o DNA genômico de *C. striata*:

RDNA1 (forward) 5' GTG CGA TCA CAG C(AG)(CT) TAA TGC ACC GG 3'

RDNA2 (reverse) 5' GAG GAG CAA CAC GAG GAC TTC CAA GGA GG 3'

Na reação de PCR foram utilizados 10ng de DNA genômico de *C. striata*, 200mM de dNTPs, 300 nM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U de Taq polimerase. A reação de PCR seguiu os seguintes passos: incubação a 93 °C por 5 min seguida por 30 ciclos de 94 °C por 50 seg, 57 °C por 50 seg e 72 °C por 1 min. Após completado os 30 ciclos, a reação foi deixada por mais 10 min a 72 °C. O produto obtido foi purificado utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, para a confirmação e quantificação dos fragmentos amplificados.

3.2.6.4 Marcação das sondas e hibridação molecular *in situ* fluorescente das sondas de DNA ribossomais 45S e 5S

Foram realizados dois experimentos de hibridação *in situ* utilizando como sondas o rDNA 45S e 5S (duplo-FISH). Um dos experimentos utilizou a sonda 45S marcada com biotina, e a sonda 5S marcada com digoxigenina; o outro experimento utilizou a sonda 45S marcada com digoxigenina e a 5S marcada com biotina. Este tipo de experimento “invertido” foi realizado para verificar se há uma diferença na hibridação das sondas em relação aos diferentes tipos de marcadores.

As sequências de DNA utilizadas como sondas foram marcadas com biotina via nick translation e digoxigenina via random primer, respectivamente, seguindo protocolos fornecidos pelos fabricantes. As preparações cromossômicas foram preparadas para hibridação com as sondas marcadas, através de lavagem com RNase (5µg/µl) e pepsina (5µg/µl), para remoção do RNA e do excesso de proteínas, respectivamente. As preparações cromossômicas foram então fixadas em paraformaldeído a 4% e desidratadas em uma série alcóolica (70%, 96% e 100%). A mistura de hibridação foi constituída de 50% formamida, 2xSSC, 10% dextran sulfato, 0,1%

SDS, 1 mg/ml de “herring sperm DNA” e de 8 e 10 ng/ml de DNA das sondas de rDNA de 45S e 5S, respectivamente para duplo-FISH. As sondas foram desnaturadas a 95-98 °C, por 10 min e imediatamente incubadas em gelo. Adicionou-se 20 µl da mistura de hibridação às preparações cromossômicas. A mistura de hibridação desnaturada e o DNA cromossômico foram aquecidos conjuntamente a 83 °C por 9 min; após tal período a temperatura foi gradualmente decrescida até 37°C utilizando-se um termociclador (PTC-100, MJ). A hibridação foi realizada a 37°C por 16 hs, seguida por lavagens em 2xSSC a 42 °C por 5 minutos; duas lavagens com formamida a 20%/0.5x SSC a 42 °C (74% de estringência) por 5 minutos; 0,5xSSC 42 °C por 5 minutos. No primeiro experimento, a sonda de rDNA de 45S marcada com biotina foi detectada com o anticorpo “mouse anti-biotin” seguido dos anticorpos “rabbit anti-mouse–TRITC” e a sonda de rDNA 5S marcada com digoxigenina foi detectada com “sheep anti-dig-FITC”. Já no experimento posterior, a sonda de rDNA de 45S marcada com digoxigenina foi detectada com o anticorpo “sheep anti-dig-rhodamine” e a sonda de rDNA 5S marcada com biotina foi detectada com “mouse anti-biotin” seguido dos anticorpos “rabbit anti mouse-FITC”. As preparações foram contra-coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 4 µg/ml e montadas em 5 µl de vectashield H-1000.

3.2.7 Microscopia e análise de imagens

As metáfases coradas pelo método de Feulgen, foram capturadas no fotomicroscópio Zeiss ao qual está acoplado uma câmara CCD, que permitiu a digitalização das imagens, através do programa IKAROS (Metasystem). As preparações fluorescentes foram observadas em fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss, igualmente acoplado a uma câmara CCD, permitindo através do programa ISIS (Metasystem), a digitalização das imagens.

Tanto as imagens digitalizadas de Feulgen, quanto as imagens digitalizadas das preparações fluorescentes foram processadas no programa Adobe PhotoShop versão 6.0, para a confecção das pranchas.

3.2.8 Medidas dos cromossomos

As medidas cromossômicas foram realizadas nas cópias impressas de oito metáfases com semelhante grau de condensação utilizando-se um compasso de ponta seca e papel milimetrado.

Cada figura das metáfases continha uma barra cuja escala correspondia a 10 μ m. Esta barra foi necessária para a conversão da escala de centímetro (cm) para micrômetro (μ m). Foram medidos o braço curto e o braço longo de cada cromossomo, obtendo-se pela soma de ambos, o comprimento absoluto dos cromossomos.

As médias dos valores obtidos para o braço curto, braço longo e comprimento absoluto dos cromossomos para cada espécie foram utilizados para calcular os seguintes itens:

- Intervalo (μ m): corresponde aos valores do maior e menor cromossomo;
- Comprimento total do lote haplóide – CTLH (μ m): somatória do comprimento dos cromossomos do lote haplóide (somatório dos comprimentos dos cromossomos/2);
- Comprimento relativo (CR%): comprimento absoluto do cromossomo/comprimento do total do lote haplóide multiplicado por 100;
- Relação de braços: comprimento do braço longo/comprimento do braço curto;
- Tamanho dos braços: média dos braços de cada par cromossômico.

Além disso, foi calculado o desvio padrão para cada item mencionado.

4 RESULTADOS

Todas as espécies estudadas apresentaram $2n=16$ cromossomos. Não houve grandes diferenças entre as medidas cromossômicas das espécies, sendo que *Crotalaria mucronata* apresentou o menor valor do lote haplóide, $20,00\mu\text{m}$ ($\pm 1,37\mu\text{m}$) e *Crotalaria lanceolata* o maior valor, $22,91\mu\text{m}$ ($\pm 2,29\mu\text{m}$).

Os tamanhos dos cromossomos também não diferiram significativamente entre as espécies, sendo o menor cromossomo encontrado em *C. mucronata*, $1,86\mu\text{m}$ ($\pm 0,20\mu\text{m}$) e o maior encontrado em *C. pallida*, $3,97\mu\text{m}$ ($\pm 0,35\mu\text{m}$). Estes valores podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características gerais do cariótipo: número cromossômico, intervalo entre maior e menor cromossomo do complemento dos cromossomos metafásicos das espécies de *Crotalaria* e comprimento total do lote haplóide (CTLH)

Espécies	2n	Intervalo (μm)	CTLH (μm)
<i>C. lanceolata</i>	16	$3,62 \pm 0,46 - 2,06 \pm 0,20$	$22,91 \pm 2,29$
<i>C. ochroleuca</i>	16	$3,47 \pm 0,45 - 2,07 \pm 0,33$	$22,31 \pm 3,10$
<i>C. pallida</i>	16	$3,97 \pm 0,35 - 1,98 \pm 0,23$	$22,48 \pm 2,43$
<i>C. mucronata</i>	16	$3,33 \pm 0,27 - 1,86 \pm 0,20$	$20,00 \pm 1,37$
<i>C. striata</i>	16	$3,43 \pm 0,24 - 1,87 \pm 0,16$	$20,89 \pm 0,89$

Os dados sobre comprimento relativo e relação de braços dos pares cromossômicos estão apresentados na Tabela 3. Através de observações visuais nota-se que as espécies apresentaram cariótipos simétricos com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figuras 1 e 8). A maioria dos valores da relação de braços são inferiores a 1,7, indicando que a maioria dos cromossomos são metacêntricos. Apenas *C. pallida* apresentou dois cromossomos com valores de 1,71 e 1,95, caracterizando cromossomos submetacêntricos.

Os comprimentos relativos dos pares cromossômicos foram parecidos entre as espécies estudadas, diferindo apenas para o cromossomo 1, onde ocorreu uma variação considerável entre o maior valor, 17,34%, para *C. pallida* e o menor valor de 14,32%, para *C. lanceolata* (Tabela 3).

O apêndice A apresenta os resultados do comprimento relativo (%) e tamanhos (μm) dos braços curto e longo dos pares cromossômicos nas espécies de *Crotalaria*.

Igualmente aos estudos anteriores, realizados por Oliveira e Aguiar-Perecin (1999) e Mondin (2003) as espécies apresentaram apenas uma constrição secundária, localizada no braço curto do cromossomo 1 (Figura 1 e 8).

Tabela 3 – Análise morfométrica dos cariótipos: comprimento relativo (%) e relação de braços dos pares cromossômicos nas espécies de *Crotalaria*

Espécies	Cromossomos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Comprimento relativo								
<i>C. lanceolata</i>	14,32 ± 1,82	14,60 ± 0,88	13,75 ± 0,75	12,83 ± 0,49	11,99 ± 0,49	11,42 ± 0,50	10,75 ± 0,32	9,12 ± 0,87
<i>C. ochroleuca</i>	15,42 ± 0,28	14,26 ± 0,14	13,93 ± 0,27	13,43 ± 0,36	12,66 ± 0,46	10,83 ± 0,34	9,99 ± 0,36	9,25 ± 0,50
<i>C. pallida</i>	17,34 ± 0,69	14,62 ± 0,26	13,81 ± 0,78	12,56 ± 0,46	11,81 ± 0,60	11,32 ± 0,33	10,36 ± 0,58	8,93 ± 0,26
<i>C. mucronata</i>	16,66 ± 0,67	14,53 ± 0,52	13,59 ± 0,49	12,39 ± 0,24	11,73 ± 0,31	11,19 ± 0,40	10,67 ± 0,26	9,31 ± 0,80
<i>C. striata</i>	16,43 ± 0,84	14,52 ± 0,59	13,43 ± 0,35	12,84 ± 1,04	11,89 ± 0,29	11,22 ± 0,41	11,01 ± 0,35	8,94 ± 0,49
Relação de braços								
<i>C. lanceolata</i>	1,15 ± 0,15	1,06 ± 0,03	1,23 ± 0,02	1,45 ± 0,12	1,62 ± 0,16	1,28 ± 0,09	1,56 ± 0,14	1,18 ± 0,20
<i>C. ochroleuca</i>	1,07 ± 0,08	1,36 ± 0,17	1,15 ± 0,03	1,5 ± 0,13	1,18 ± 0,09	1,39 ± 0,12	1,10 ± 0,05	1,39 ± 0,14
<i>C. pallida</i>	1,18 ± 0,09	1,20 ± 0,10	1,71 ± 0,16	1,53 ± 0,25	1,95 ± 0,08	1,30 ± 0,12	1,28 ± 0,12	1,16 ± 0,08
<i>C. mucronata</i>	1,43 ± 0,15	1,13 ± 0,04	1,49 ± 0,14	1,45 ± 0,25	1,61 ± 0,23	1,17 ± 0,07	1,41 ± 0,16	1,25 ± 0,11
<i>C. striata</i>	1,27 ± 0,08	1,20 ± 0,11	1,35 ± 0,20	1,66 ± 0,16	1,39 ± 0,15	1,58 ± 0,25	1,23 ± 0,06	1,22 ± 0,11

A coloração com o fluorocromo cromomicina A₃ revelou fluorescência apenas nas regiões adjacentes à região organizadora do nucléolo (RON) para todas as espécies analisadas (Figura 2), indicando que estas regiões são ricas em GC (SCHWEIZER, 1976).

Apesar do fluorocromo cromomicina A₃ ser específico às regiões ricas em GC, estas regiões podem conter inúmeros resíduos com os nucleotídeos AT. A utilização de distamicina, um contra-corante não fluorescente, em combinação com o fluorocromo cromomicina A₃ permite diferenciar as regiões ricas em GC sem resíduos de AT daquelas com resíduos, pois a distamicina A compete com os sítios de ligação AT circunvizinhos às regiões GC, impedindo a ligação da cromomicina e consequentemente que estas regiões apareçam fluorescentes (SCHWEIZER, 1981; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

Em todas as espécies estudadas, a combinação do fluorocromo cromomicina A₃ e distamicina A apresentou o mesmo padrão de marcas fluorescentes que o encontrado nas preparações coradas apenas com cromomicina A₃, sendo a única diferença a intensidade da

marcação. Portanto, esta combinação mostrou apenas fluorescência mais intensa nas regiões adjacentes à região organizadora do nucléolo (Figura 3).

Em relação às colorações específicas para as regiões ricas em nucleotídeos AT, tanto a utilização do fluorocromo DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol), quanto a combinação do fluorocromo DAPI e do contra-corante AMD (Actinomicina D) não resultaram em regiões cromossômicas fluorescentes (Figura 4 e 5). Apenas mostraram fluorescência reduzida nas regiões adjacentes à região organizadora do nucléolo como esperado, uma vez que estas regiões são ricas em GC, sendo este resultado uma contraprova do anterior.

Embora as técnicas até agora descritas apresentem o mesmo padrão de marcas cromossômicas para todas as espécies estudadas, a dupla hibridação *in situ* com as sondas de rDNA 45S (seqüência de rDNA 18S-5.8S-25S) e rDNA 5S resultou em diferentes padrões de marcações entre as espécies.

Na espécie *C. lanceolata* a sonda de rDNA 45S hibridizou na constrição secundária do cromossomo 1 e nas regiões adjacentes a esta. A sonda de rDNA 5S foi mapeada próximo a posição da sonda de rDNA 45S, no braço curto do cromossomo 1 (Figura 6A).

Crotalaria ochroleuca apresentou três tipos de marcações em relação à sonda rDNA de 45S: 42,85% das células analisadas apresentaram apenas a constrição secundária marcada (Figura 6 B1); 42,85% apresentaram além da constrição, um sítio adicional em apenas um dos homólogos do cromossomo 4 (Figura 6 B2) e 14,3% foram marcados a constrição secundária do cromossomo 1 e o par de homólogo do cromossomo 4 (Figura 6 B3). Semelhantemente em *C. lanceolata*, a sonda de rDNA 5S hibridizou adjacente a sonda de rDNA 45S, no braço curto do cromossomo 1 (Figura 6B).

Alguns autores utilizam os sinônimos *C. mucronata*, *C. striata* e *C. pallida*, como espécies distintas apresentando descrições cariotípicas para cada espécie (RAINA; VERMA, 1979). Neste trabalho, este tipo de classificação também foi adotado para a comparação entre os marcadores cromossômicos dos cariótipos, apenas de modo ilustrativo já que se trata de populações diferentes da mesma espécie.

Todas estas populações apresentaram o mesmo padrão de sítios de hibridação *in situ*. A sonda de rDNA 45S marcou a constrição secundária e as regiões adjacentes a esta do cromossomo 1. Próximo ao sítio de localização da sonda de rDNA 45S foi mapeado a sonda de rDNA 5S no braço curto deste par. Diferentemente das outras espécies, nestas populações foram

observados dois pares de sítios adicionais de rDNA 5S, um maior encontrado no braço curto do cromossomo 5 e um menor no braço curto do cromossomo 6 (Figuras 7 e 9).

Observou-se uma diferença no tamanho das marcações da sonda rDNA 5S no cromossomo 1 das diferentes populações de *C. pallida* quando comparada com as espécies *C. lanceolata* e *C. ochroleuca*. Nestas últimas, a marcação parece ser maior quando comparadas com as de *C. pallida* (Figuras 6, 7 e 8). Esta diminuição provavelmente está relacionada aos sítios adicionais encontrados nesta espécie, que em decorrência do aumento do número de sítios, o rDNA encontrado no cromossomo 1, pôde sofrer perdas de seqüências durante a evolução sem acarretar grandes danos para a espécie.

Para todas as espécies verificou-se que os sítios de rDNA 45S na constrição secundária do cromossomo 1 e nas regiões adjacentes a esta constrição correspondem às regiões fluorescentes positivas para as colorações CMA e CMA/DA, indicando que as regiões organizadoras do nucléolo são ricas em GC (Figura 9).

Nas espécies analisadas foram encontradas em todos os cromossomos heterocromatinas fluorescentes pericentroméricas de natureza neutra. Estas regiões heterocromáticas pericentroméricas não foram detectadas com os fluorocromos CMA e DAPI. Elas aparecem como consequência da desnaturação e renaturação do DNA, durante o processo de hibridação (Figuras 7 e 8) e provavelmente são resultadas de um processo de diferenciação dos arranjos de DNA da heterocromatina durante a evolução. Um outro processo de diferenciação das heterocromatinas pericentroméricas já foi observado para as espécies com flores especializadas, que apresentaram CMA⁺, porém são CMA/DA⁻, indicando diferenças no conteúdo de GC ou nos resíduos de AT (MONDIN, 2003).

Apesar das diferenças encontradas pela hibridação *in situ* dos rDNAs, verifica-se que há um padrão semelhante em relação aos marcadores cromossômicos para a seção Hedriocarpaceae, subseção Macrostachyae (Figura 9), principalmente quando comparados às outras espécies de outras seções previamente estudadas por Mondin (2003) (Figura 10).

Ao se comparar as espécies com flores especializadas com as espécies sem especialização floral nota-se que as primeiras possuem na maioria das espécies heterocromatinas pericentroméricas ricas em GC, enquanto as espécies com flores sem especialização floral possuem apenas os sítios de rDNA 45S ricos em GC, ou ainda dois sítios adicionais não relacionados ao rDNA 45S, como em *C. incana*. Além disso, diferem também em relação ao rDNA 5S, onde nas espécies com flores especializadas esse sítio está localizado no braço longo

do cromossomo 1, enquanto que em *C. incana* aparece no braço longo do cromossomo 3, e nas espécies da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae, o sítio aparece no braço curto, provavelmente consequência de uma inversão pericêntrica, como será discutido mais adiante (Figura 10).

Sendo assim, os resultados obtidos com a utilização de técnicas de coloração com fluorocromos e hibridação molecular *in situ* de sondas de rDNA 45S e 5S tanto para as espécies estudadas, quanto para as espécies analisadas previamente por Mondin (2003), permitem inferir sobre os eventos cromossômicos ocorridos durante a evolução do gênero.

Figura 1 – Cariótipos das espécies *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E)

Figura 2 - Metáfases coradas com o fluorocromo cromomicina A₃ nas espécies *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E). As setas indicam as regiões ricas em GC, localizadas no par 1. Barra= 10μm

Figura 3 - Metáfases das espécies *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E), coradas com a combinação cromomicina A₃/distamicina A. As setas indicam as regiões ricas em GC, localizadas no par 1. Barra= 10µm

Figura 4 - Metáfases das espécies *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E), coradas com o fluorocromo DAPI. As setas indicam as regiões com fluorescência negativa localizadas na constrição secundária do par 1. Barra= 10μm

Figura 5 - Metáfases das espécies *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E), coradas com a combinação DAPI/AMD. As setas indicam as regiões fluorescentes negativas, localizadas na contração secundária no par 1. Barra= 10μm

Figura 6 - Metáfases mitóticas das espécies *C. lanceolata* (A) e *C. ochroleuca* (B), após FISH com sondas de rDNA 45S (vermelho) e 5S (verde). As setas brancas indicam a constrição secundária do par 1 marcada com a sonda de rDNA 45S e adjacente a ela o rDNA 5S, posicionado no braço curto. *C. ochroleuca* apresentou três tipos de marcação em relação à sonda 45S: a primeira marcando a constrição secundária (B1); outra marcando a constrição e apenas um dos cromossomos 4 (B2), ou marcando o par do cromossomo 4 (B3). As setas amarelas destacam a heterocromatina fluorescente de natureza neutra, localizadas nas regiões pericentroméricas, consequência da desnaturação e renaturação do DNA, durante o processo de hibridação. Estas regiões pericentroméricas não apresentam fluorescência quando coradas com CMA ou DAPI. Barra= 10µm

Figura 7 - Metáfases mitóticas das espécies *C. pallida* (A); *C. mucronata* (B) e *C. striata* (C) após FISH com sondas de rDNA 45S (vermelho) e 5S (verde). As setas brancas indicam a constrição secundária no par 1, marcada com a sonda de rDNA 45S e adjacente a ela o rDNA 5S posicionado no braço curto. As setas rosa apontam para dois sítios adicionais de 5S no braço curto dos cromossomos 5 e 6 destas espécies. As setas amarelas destacam a heterocromatina fluorescente de natureza neutra, consequência da desnaturação e renaturação do DNA, durante a hibridação. Barra= 10 μ m

Figura 8 – Idiogramas dos cariótipos das espécies de *Crotalaria*. *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E)

Figura 9 – Mapas citogenéticos dos cromossomos de espécies de *Crotalaria*. *C. lanceolata* (A), *C. ochroleuca* (B), *C. pallida* (C), *C. mucronata* (D) e *C. striata* (E). O asterisco (*) representa uma marcação do rDNA 45S instável

Figura 10 – Modelo integrado entre as relações filogenéticas de seções botânicas do gênero *Crotalaria* (adaptado de Polhill, 1982) e a estrutura dos kariótipos das espécies anteriormente estudadas por Mondin (2003) e as do presente trabalho

5 DISCUSSÃO

5.1 Estrutura dos cariótipos

A maioria das espécies do gênero *Crotalaria* apresenta cariótipos simétricos com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999), número cromossômico diplóide $2n=16$ cromossomos, com apenas uma constrição secundária no braço curto do cromossomo 1 (RAINA; VERMA, 1979; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; MONDIN 2003), com exceção de *C. spectabilis*, que apresenta a constrição secundária no braço longo do cromossomo 1 (OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; MONDIN, 2003).

Em *Crotalaria*, tanto o tamanho quanto a morfologia dos cromossomos são relativamente semelhantes, dificultando a identificação individual dos pares. Por isso, além de medidas cromossômicas realizadas em metáfases mitóticas com boa morfologia, o uso de marcadores cromossômicos, obtidos a partir da utilização de fluorocromos específicos às regiões ricas em GC ou AT, além de sondas de rDNA, são ferramentas indispensáveis a identificação precisa dos cromossomos.

Muitos trabalhos já demonstraram que as regiões associadas às regiões organizadoras do nucléolo são ricas em nucleotídeos GC (SCHWARZACHER; SCHWEIZER, 1982; FUCHS, et al. 1998; RUAS, et al. 2005; CUCO, et al. 2005; MARCON; BARROS; GUERRA, 2005; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN; 2007). As espécies estudadas da seção Hedriocarpae, subseção Macrosthachyae apresentaram regiões fluorescentes para cromomicina A_3 nas regiões associadas às RONS.

A combinação do fluorocromo cromomicina A_3 com o contra-corante, não fluorescente, distamicina A não resultou para as espécies de *Crotalaria* da seção Hedriocarpae, em qualquer tipo de diferenciação em relação àquelas encontradas na coloração apenas com CMA, porém foi detectado um pequeno aumento da intensidade da fluorescência. Este processo já foi descrito para *Vicia faba* e *Scilla siberica* onde o fluorocromo associado ao contra-corante metil-green, provocou uma alteração no contraste das bandas (SCHWEIZER, 1976).

No entanto, nas espécies da seção Calycinae e *Crotalaria* foram encontrados uma alteração qualitativa no padrão de bandas com o emprego das colorações com CMA e com CMA/DA, diferenciando as bandas pericentroméricas, marcadas apenas com CMA, das regiões associadas à RON, marcadas com CMA e CMA/DA (MONDIN, 2003).

O uso do fluorocromo DAPI ou da combinação DAPI/AMD não revelou nenhuma banda com fluorescência positiva, apenas nas regiões associadas à região organizadora do nucléolo foi observada fluorescência negativa, corroborando com a evidência destas regiões serem ricas em GC. Este padrão de fluorescência para as regiões organizadoras do nucléolo também foi encontrado para as espécies *C. juncea*, *C. stipularia*, *C. paulina* e *C. spectabilis*, com fluorescência reduzida nas regiões associadas às RONS (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

Apesar das espécies de *Crotalaria* não apresentarem bandas DAPI e DAPI/AMD positivas, a espécie *C. incana* apresentou sinais fluorescentes, indicando regiões ricas em AT (MONDIN, 2003). Sendo assim, um estudo em um maior número de espécies com flores não especializadas deveria ser realizado, para verificar se este padrão é peculiar a esta espécie ou se aplica as outras espécies.

As espécies pertencentes à seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae apresentaram os mesmos padrões de bandas tanto entre as colorações CMA e CMA/DA, assim como entre as colorações DAPI e DAPI/AMD. Esta correspondência entre os marcadores cromossômicos obtidos tanto para CMA e CMA/DA, como para DAPI e DAPI/AMD também foi observada por Mondin (2003) em *C. incana* e sugerido que estas regiões teriam sofrido diversificação das seqüências repetitivas, sendo consideradas regiões DNA espécie-específico (MONDIN, 2003). Porém, todas estas espécies citadas possuem flores sem especialização floral, podendo esta diversificação ser específica para o grupo de espécies sem especialização floral.

Como já mencionado, as regiões organizadoras do nucléolo de todas as espécies analisadas foram ricas em nucleotídeos GC, uma vez que apresentaram padrões fluorescentes tanto para a coloração utilizando apenas CMA quanto para CMA/DA. No entanto, a marcação inconstante de rDNA 45S encontrada no braço curto do cromossomo 4 de *C. ochroleuca* não resultou em fluorescência CMA positiva. Esta não visualização de fluorescência CMA pode ser consequência do pequeno tamanho desta região e as colorações com CMA e CMA/DA não são suficientemente sensíveis a este sítio. Esta observação pode ser apoiada pelo fato da marcação rDNA 45S ser instável para esta região, reforçando a idéia de que este seja um sítio muito pequeno. Além disso, *C. incana* apresentou dois sítios adicionais de rDNA 45S nos cromossomos 4 e 5 que não apresentaram fluorescência com a coloração com CMA e CMA/DA, devido ao tamanho reduzido dos sítios (MONDIN, 2003).

Provavelmente este sítio adicional de rDNA 45S em *C. ochroleuca* não é ativo, pois para as espécies de gramíneas, RONS ativas quando não formam constrição secundária, apresentam pelo menos uma banda maior que 0,2 μ m, que marquem pela técnica de nitrato de prata e sejam cromomícina positiva e DAPI negativo (WINTERFELD; RÖSER, 2007). Os resultados encontrados para rDNA 45S no cromossomo 4 de *C. ochroleuca* se enquadram nesta descrição, no entanto, para uma confirmação da ativação ou não deste sítio, a técnica de impregnação com nitrato de prata deve ser realizada.

Os sinais das sondas de rDNA 5S das espécies estudadas não foram CMA nem CMA/DA positivo, como era de se esperar, já que esta correspondência na literatura é rara. Todavia, dentro do gênero *Crotalaria*, para as espécies *C. juncea*, *C. retusa*, *C. incana* e *C. spectabilis*, já foi relatado a correspondência entre sítios de rDNA 5S e sinais CMA positivos (MONDIN, 2003) assim como para as espécies *Hypochaeris brasiliensis* e *Hypochaeris megapotamica* (RUAS, et al. 2005).

Variabilidade no número de sítios adicionais rDNA tem sido relatado para muitas espécies de plantas e tem sido sugerido muitas explicações para tal fato.

Em *Phaseolus vulgaris* a variação no número de loci rDNA 45S foi explicado através de vários mecanismos de amplificações que ocorreram independentemente, amplificação esta ocorrida antes da domesticação da espécie (PEDROSA-HARAND, et al., 2006).

Porém no gênero *Allium*, Schubert (1984) e Schubert e Wobus (1985) observaram o surgimento de novos sítios ativos de DNA ribossômicos corados com nitrato de prata e mapeados por hibridação *in situ*, e concluíram que rDNA tem uma natureza móvel. Esta explicação também foi utilizada nos gêneros *Oryza*, *Passiflora* e *Pinus* pra explicar a variabilidade nos sítios de rDNA encontradas em espécies destes gêneros (SHISHIDO; SANO; FUKUI, 2000; MELO; GUERRA, 2003, CAI, et al. 2006).

Datson e Murray (2006) sugerem três possíveis mecanismos para explicar as mudanças das posições dos genes ribossomais nas espécies de *Nemesia*: inversões, translocações e transposição. Através de estudos do comportamento meiótico das espécies, os autores supõem que a transposição dos rDNAs é o melhor mecanismo para explicar tais mudanças.

A melhor demonstração de que o rDNA pode sofrer transposição foi realizado em *Aegilops speltoides*, onde os autores observaram a associação dos transposons *En/Spm* com os rDNAs 45S e 5S e puderam concluir que esta transferência pode ser de dois tipos: específica ao genoma, movendo o rDNA 45S do cromossomo 1 ou 6 para o cromossomo 5; ou ainda específica

à célula, incluindo a mudança de posição do rDNA 5S dentro do cromossomo 5. Esta mobilidade esta ligada em parte a atividade meiótica dos transposons *En/Spm* (RASHINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a). Esses mesmos autores trabalhando com duas populações pequenas de *Ae. speltoides* e *Ae. sharonensis* encontraram um padrão de cariótipo em relação ao rDNA para a *Ae. sharonensis* e quatro padrões de organização dos rDNAs para a *Ae. speltoides*, padrões estes que se assemelhavam a cariótipos intermediários entre ambas espécies. Partindo do pressuposto que *Ae. sharonensis* era derivada de *Ae. speltoides*, os autores sugeriram dois eventos de especiação utilizando o remodelamento dos rDNAs 5S e 45S: o aparecimento de um novo bloco de rDNA 5S no cromossomo 1 e a transposição do rDNA 45S do cromossomo 1 para o cromossomo 5 (RASHINA; BELYAYEV; NEVO, 2004b). Este resultado indica que o rDNA pode sofrer transposição e este processo pode ser um importante fenômeno durante a diversificação das espécies.

Apesar dos indícios sugerirem a intervenção da transposição do rDNA 45S por transposons do tipo *En/Spm*, há evidências de que a atividade desses transposons sejam responsáveis pelo menos em parte pela mobilidade principalmente dos sítios rDNAs 5S, devido a co-localização de rDNAs 5S com transposons *En/Spm* encontrados em espécies de Triticeae e Poaceae (RASHINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a; ALTINKUT, et al., 2006a; ALTINKUT, et al., 2006b).

No entanto, algumas espécies de leguminosas, como em *Pisum sativum*, que não possuem seqüências de elementos de transposição na constrição secundária (NEUMANN; NOUZOVÁ; MACAS, 2001), sugere que a mobilidade do rDNA 45S pode ser explicada também pela recombinação e rearranjos cromossômicos (ABIRACHED-DARMENCY, et al. 2005).

Os sítios adicionais encontrados nas espécies estudadas provavelmente são resultados de eventos de transposição, pois tanto em *C. pallida*, *C. mucronata* e *C. striata* que possuem dois sítios adicionais do rDNA 5S, como em *C. ochroleuca* que possui um rDNA 45S adicional, o sinal do rDNA 5S e do rDNA 45S encontrado no cromossomo 1, das respectivas espécies, demonstraram uma redução em sua intensidade, provavelmente fruto de translocação de partes destas regiões para os novos sítios, onde são normalmente ausentes. Esta situação já foi reportada em *Aegilops speltoides* (RASHINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a).

Embora os cariótipos das espécies, da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae, não diferiam muito entre si, o uso de colorações com fluorocromos e hibridação molecular *in situ* são importantes ferramentas, que geram marcadores cromossômicos que auxiliam na identificação de

cromossomos individuais. Estes marcadores ajudam não apenas a compreender a organização cromossômica dentro de cada seção e subseção botânica, mas também possibilitam a compreensão da evolução cromossômica de todo o gênero, como será visto a seguir.

5.2 Evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* através do uso de marcadores citogenéticos

O gênero *Crotalaria* possui cerca de 600 espécies divididas em oito seções e nove subseções (POLHILL, 1968; BYSBY; POLLHIL, 1973), e conforme a complexidade floral, as espécies podem ser diferenciadas em dois grupos: um com espécies possuindo especialização das flores, e um segundo, com espécies sem especialização floral (BYSBY; POLLHIL, 1973).

A citogenética é uma ferramenta adicional que aliada a dados botânicos, fornece embasamento para a classificação taxonômica, além de auxiliar na compreensão da evolução cariotípica e ajuda a elucidar o processo de diversificação sofrido durante a evolução do gênero.

Essa conexão entre a botânica e a citogenética em *Crotalaria* foi primeiramente realizada por Boulter, et al. (1970). Os autores estudando algumas espécies devidamente agrupadas em seções e subseções puderam constatar uma correlação entre tamanho cromossômico e especialização floral. As espécies com especialização floral possuíam cromossomos menores, enquanto as espécies com flores não especializadas possuíam cromossomos maiores (BOULTER, et al., 1970).

Esta correlação também foi observada por Oliveira e Aguiar-Perecin (1999), mostrando que cada seção botânica possui características em relação à simetria e ao tamanho cromossômico, indicando que nas seções mais especializadas, a evolução cariotípica aponta para uma redução no tamanho cromossômico e um aumento no grau de assimetria.

No entanto, a maioria dos trabalhos citogenéticos realizados em *Crotalaria* não classificam as espécies em seções e subseções, não conseguindo, portanto, realizar grandes observações sobre a evolução do gênero.

A utilização de marcadores cromossômicos, gerados por colorações com fluorocromos e hibridação molecular *in situ*, combinados a dados botânicos previamente estabelecidos é uma estratégia importante, principalmente para gêneros como *Crotalaria*, que possuem uma similaridade na morfologia e no número constante dos cromossomos das espécies diplóide, adicionando importantes dados para o entendimento da evolução de cariótipo.

As espécies analisadas pertencem à seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae e possuem flores sem estruturas especializadas e apresentaram padrões citogenéticos pertinentes com sua classificação e característicos para a subseção.

Todas as espécies possuem sítios de rDNA 45S, cromomicina positivo, na constrição secundária localizada no braço curto do cromossomo 1. O padrão deste marcador está de acordo com as outras espécies analisadas por Mondin (2003) pertencentes a diferentes seções botânicas, com exceção de *C. spectabilis* que devido a uma inversão pericêntrica apresenta a constrição secundária no braço longo do cromossomo 1 (OLIVEIRA E AGUIAR-PERECIN, 1999; MONDIN, 2003).

Sítios adicionais de rDNA 45S, como o encontrado em *C. ochroleuca*, já foram descritos para as espécies *C. juncea*, *C. paulina*, *C. stipularia* e *C. incana* (Mondin, 2003). A espécie *C. juncea* possui o sítio adicional na porção proximal do braço longo do cromossomo 4. A espécie *C. paulina* é uma espécie poliplóide, da mesma seção de *C. juncea* e apresenta um sítio adicional rDNA no braço curto do cromossomo 2, e outro no braço longo do cromossomo 8. Estes cromossomos são provavelmente homeólogos aos cromossomos 1 e 4, respectivamente de *C. juncea*. *C. stipularia*, também poliplóide pertencente à seção Calycinae, apresenta um sítio na parte proximal no braço curto do cromossomo 8, provavelmente resultado de uma inversão pericêntrica (MONDIN, 2003).

O sítio adicional rDNA 45S de *C. ochroleuca* poderia ser interpretado de imediato como o resultado de uma inversão pericêntrica, pois nesta espécie, este sítio está localizado no braço curto do cromossomo 4, enquanto que em *C. juncea*, o rDNA adicional se encontra localizado no braço longo do cromossomo 4. No entanto, esta hipótese não pode estar correta, pois seções intermediárias entre estas espécies não apresentam esse tipo de sítios adicionais, apontando que estes sítios são decorrentes de eventos independentes que ocorreram no curso da evolução.

Apesar destes sítios serem resultados de eventos independentes, eles provavelmente são consequência de transposição, como sugerido para a espécie de *Aegilops speltoides* (RASHINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a).

Outros sítios adicionais de rDNA 45S foram encontrados nas porções subterminal e terminal do braço curto dos cromossomos 4 e 5, respectivamente em *C. incana* (MONDIN, 2003), sendo provavelmente originados também a partir de eventos de transposições.

Tanto as espécies da subseção Macrostachyae como as da seção Chrysocalycinae, diferentemente das seções com espécies com flores especializadas, não apresentam

heterocromatinas pericentroméricas ricas em GC, sugerindo um ganho de heterocromatinas ricas em GC nas espécies com especialização floral (MONDIN, 2003). Entretanto, durante a hibridação molecular *in situ* foram detectadas heterocromatinas pericentroméricas, o que sugere que durante o curso da evolução houve mudanças nestas seqüências (evolução concertada) alterando sua constituição quanto ao conteúdo de GC e por consequência sua detecção com fluorocromos. Estes dados corroboram com a classificação botânica do gênero, demonstrando uma similaridade citogenética entre seções relacionadas, além de padrões diferentes entre as espécies com ou sem especialização floral (BYSBY; POLLHIL, 1973).

Outro importante resultado foi observado para o DNA ribossômico 5S. Todas as espécies analisadas apresentaram sítio rDNA 5S adjacente a marcação 45S na parte distal do cromossomo 1, além de adicionais marcas no braço curto do cromossomo 5 e 6 de *C. pallida*, *C. mucronata* e *C. striata*. Ao contrário, das outras espécies anteriormente estudadas por Mondin (2003) que apresentaram estas marcas no braço longo do cromossomo 1, como no caso de *C. spectabilis*, *C. retusa* e *C. juncea*, no cromossomo 3 de *C. incana*, no cromossomo 4 de *C. grantiana* e no cromossomo 8 de *C. paulina* e *C. stipularia*.

Estes dados obtidos através do uso do marcador cromossômico de rDNA 5S indicam uma inversão pericentromérica envolvendo o sítio ribossômico 5S do cromossomo 1, sendo que esta inversão está fixada nas espécies da subseção Macrosthachyae. Porém, para obtenção de informações mais precisas sobre esta inversão, e esclarecimento se este evento é característico a esta subseção ou se é anterior à derivação desta, devem ser analisadas espécies pertencentes a seções consideradas mais primitivas, como a seção Chrysocalycinae, subseção Glaucæ.

O sítio rDNA 5S localizado no cromossomo 3 em *C. incana*, provavelmente seja o resultado de uma translocação (MONDIN, 2003). Alguns autores sugerem que esta espécie com $2n=14$ cromossomos, tenha surgido através de translocações, a partir de uma espécie pertencente a sua própria seção, com $2n=16$ cromossomos (ATCHINSON, 1950; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; MONDIN, 2003). Este mecanismo de redução do número cromossômico através de translocações, foi proposta por Stebbins (1971) e recentemente foi demonstrado para *Arabidopsis thaliana* e espécies afins na família Brassicaceae (LYSAK, et al. 2006).

As espécies de *Crotalaria* se caracterizam por não possuírem bandas ricas AT, não sendo encontrado nenhuma banda DAPI positiva, tanto nas espécies analisadas neste trabalho, quanto nas espécies estudadas por Mondin (2003), com exceção para *C. incana*, que apresentou regiões ricas em AT dispersas nos cromossomos. Esta espécie é considerada primitiva e em consequência

deste fato, possui um cariótipo peculiar a ela, permitindo a adaptação em diferentes ambientes (MONDIN, 2003).

As espécies de *Crotalaria* não possuem grandes diferenças em relação ao número, ao formato e ao tamanho cromossômico encontrados entre as espécies, sendo portando, os marcadores cromossômicos eficientes ferramentas para a análise e compreensão da evolução cariotípica de *Crotalaria*. Certamente, outras espécies pertencentes a outras seções botânicas devem ser estudadas, para o entendimento da evolução no gênero como todo, utilizando estes e outros marcadores cromossômicos. No entanto, os resultados obtidos neste estudo apóiam a teoria primeiramente proposta por Mondin (2003), onde sugere-se diferenças na organização dos genomas entre as espécies com flores especializadas das espécies sem especialização floral. Além disso, os dados indicam que a evolução do gênero foi impulsionada principalmente por rearranjos cromossômicos e modificações nas seqüências de DNA altamente repetitivo através da evolução concertada que alteraram principalmente o conteúdo de GC nas regiões pericentroméricas.

6 CONCLUSÕES

As técnicas de coloração com fluorocromos e hibridação molecular *in situ* forneceram marcadores cromossômicos, possibilitando uma análise detalhada dos cariótipos das espécies pertencentes à seção Hedriocarpae e subseção Macrostachyae. Foi verificado a presença de rDNA 45S na constrição secundária do braço curto do cromossomo 1 e adjacente a esta na porção distal, um sítio de DNA ribossômico de 5S. A associação destes sinais é decorrente de uma inversão pericêntrica e fornece um marcador cromossômico específico para este grupo. Além disso, sinais adicionais de rDNA são comuns para espécies desta subseção botânica. Estes sinais provavelmente são decorrentes de transposição.

Os resultados estão de acordo com a hipótese elaborada por Mondin (2003) de que as espécies com flores especializadas possuem diferenças na organização cromossômica quando comparadas às espécies sem especialização floral, contribuindo com a divisão do gênero em dois grandes grupos: espécies com especialização floral e espécies sem especialização das flores. No entanto, um maior número de espécies deve ser estudado utilizando estes e outros marcadores, a fim de esclarecer pontos ainda em abertos, assim como ampliar os marcadores para as seções botânicas ainda não analisadas e demonstrar todos os eventos cromossômicos envolvidos durante a evolução de *Crotalaria*.

REFERÊNCIAS

- ABIRACHED-DARMENCY, M.; PRADO-VIVANT, E.; CHELYSHEVA, L.; POUTHIER, T. Variation in rDNA locus number and position among legume species and detection of 2 linked rDNA loci in the model *Medicago truncatula* by FISH. **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 556-561, 2005.
- AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T. A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginellic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, Londres, v. 67, p. 956-964, 2006.
- ALI, H.B.; MEISTER, A.; SCHUBERT, I. DNA content, rDNA loci, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 1027-1032, 2000.
- ALMADA, R. D.; DAVIÑA, J. R.; SEIJO, J. G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South American species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 150, p. 329-341, 2006.
- ALTINKUT, A.; KOTSERUBA, V.; KIRZHNER, V. M.; NEVO, E.; RASKINA, O.; BELYAYEV, A. Ac-like transposons in populations of wild diploid Triticeae species: comparative analysis of chromosomal distribution **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 14, p. 307-317, 2006a.
- ALTINKUT, A.; RASKINA, O.; NEVO, E.; BELYAYEV, A. *En/spm*-like transposons in Poaceae species: transposase sequence variability and chromosomal distribution. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 11, p. 214-229, 2006b.
- ATCHINSON, E. 1950 Studies in the Leguminosae. V. Cytological observations on *Crotalaria*. **Journal of the Elisha Mitchell Science Society**, Carolina do Norte, v. 66, p. 70-75, 1950.
- BERTÃO, M.R. **Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. 1993. 148p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.
- BISBY, F. A. The evaluation and selection of the characters in Angiosperm taxonomy: an example from *Crotalaria* L. **New Phytologist**, Londres, v. 69, p. 1149-1160, 1970.
- BISBY, F. A. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. I. Empirical comparisons of methods using *Crotalaria* L. **New Phytologist**, Londres, v. 72, p. 699-726, 1973.
- BISBY, F. A.; POLHILL, R. M. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. II. Parallel taximetrics and orthodox studies in *Crotalaria* L.. **New Phytologist**, Londres, v. 72, p. 727-742, 1973.

BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; POLHILL, R.M. Observations on the cytology and seed-proteins of various African species of *Crotalaria* L. (Leguminosae). **New Phytologist**, Londres, v. 69, p. 117-131, 1970.

CAI, Q.; ZHANG, D.; LIU, Z.; WANG, X. Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. **Annals of Botany**, Londres, v. 97, p. 715-722, 2006.

CAMPO, M. L. del; SMEDLEY, S. R.; EISNER, T. Reproductive benefits derives from defensive plant alkaloid possession in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Nova Iorque, v. 102, p. 13508-13512, 2005.

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

CUCO, S. M., VIEIRA, M. L. C., MONDIN, M., AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Florência, v. 58, n. 3, p. 220-228, 2005.

DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 14, p. 845-857, 2006.

DOYLE, J. J.; CHAPPILL, J. A.; BAILEY, D. C.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in Legume Systematics**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. chap. 1, p. 1-20.

FILLIETAZ, A., M. **Estudos taxonômicos de espécies de *Crotalaria* sect. *Calycinae* Wight & Arn. (Leguminosae – Papilionoideae – Crotalarieae) no Brasil**. 2002. 145p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

FLAVELL, R.B. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. **Genome**, Ottawa, v. 31, p. 963-968, 1989.

FRIEBE, B.; ENDO, T. R.; GILL, B. S. Chromosome-banding methods. In: FUKUI, K.; SHIGEKI, N. (Ed.) **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC Press, 1996. chap.7, p. 123-154.

FLORES, A. S. **Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) no Brasil**. 2004. 196p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FLORES, A. S.; CORRÊA, A. M.; FORNI-MARTINS, E. R.; TOZZI, A. M. G. A. Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilioideae) and their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 151, p. 271-277, 2006.

FLORES, A. S.; MIOTTO, S. T. S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 245-249, 2005.

FUCHS, J.; STREHL, S.; BRANDES, A.; SCHWEIZER, D.; SCHUBERT, I. Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome – heterocromtin differentiation, replication patterns and sequence localization. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 6, p. 219-230, 1998.

GEPTS, P., W.D. BEAVIS, E.C. BRUMMER, R.C. SHOEMAKER, H.T. STALKER, N.F. WEEDEN, AND N.D. YOUNG. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, p. 1228-1235, 2005.

GERLACH, W. L.; DYER, T. A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 21, p. 4851-4865, 1980.

GOLDBLATT, P. Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.) **Advances in legume Systematics**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. pt. 2, chap. 55, p. 191-208.

GOTTLOB-MCHUGH, S. G.; LEVESQUE, M.; MACKENZIE, K.; OLSON, M.; YAROSH, O.; JOHNSON, D. A. Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. **Genome**, Ottawa, v. 33, n. 4, p. 486-494, 1990.

GUPTA, P. K. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Crotalaria* (Angiospermae, Leguminosae). **Chromosoma**, Nova Iorque, v. 54, p. 155-164, 1976.

GUPTA, R.; GUPTA, P.K. Karyotype studies in the genus *Crotalaria* Linn. **Cytologia**, Tóquio, v. 43, p. 357-369, 1978a.

GUPTA, R.; GUPTA, P.K. Pachytene karyotype in the genus *Crotalaria* L (Leguminosae). **Cytologia**, Tóquio, v. 43, p. 655-663, 1978b.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 617-635, 2000.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolos organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, Basel, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K. PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J. ;NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A. Concerted DNA Methylation/Histone Methylation Switch Regulates rRNA Gene Dosage Control and Nucleolar Dominance. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 3, p. 599-609, 2004.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 82, p. 651–663, 2004.

LEWIS, G. **Legumes of Bahia**. Rotterdam: Royal Botanic Gardens, Kew, 1987. 369p.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the world**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 592p.

LYSAK, M. A.; BERR, A.; PECINKA, A.; SCHMIDT, R.; MCBREEN, K.; SCHUBERT, I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species **Proceedings National Academy Science of the United States of América**, Nova Iorque, v. 103, p. 5224–5229, 2006.

MARCON, A. B.; BARROS, I. C. L.; GUERRA, M. Variation in chromosome numbers, CMA bands and 45S rDNA sites in species of *Selaginella* (Pteridophyta). **Annals of Botany**, Londres, v. 95, p. 271-276, 2005.

MASCIA, P. N.; RUBENSTEIN, I.; PHILLIPS, R. L.; WANG A. S.; XIANG L. Z. Localization of the 5S rRNA genes and evidence for diversity in the 5S rDNA region of maize. **Gene**, Amsterdam, v. 15, p. 7-20, 1981.

MCCLINTOCK, B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, Viena, v. 21, p. 294–328, 1934.

MEDINA, J.C. **Plantas Fibrosas da Flora Mundial**. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959. 913p.

MELO, N. F. de; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, Londres, v. 92, p. 309-316, 2003.

MONDIN, M. **Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**. 2003. 115p (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MORALES, A. G.; ANDRADE, L.M.; MOLINA, S. C. M. Citogenética do gênero *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae): da clássica a molecular. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE CITOGENÉTICA Y EVOLUCIÓN, 2, 2007a, Palmira. **Memórias**. Palmira: Universidad Nacional de Colômbia, 2007a. p. 189-195.

- MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; FUCHS, M. C. P.; ANDRADE, L.M.. Chromosomal evolution of the genus *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) and its taxonomy relationships. In: INTERNATIONAL CHROMOSOME CONFERENCE, 2007b, Amsterdam. **Chromosome Research**. Hingham: Springer, 2007b. v. 15. p. 37-37.
- MONDIN, M.; DOCHA NETO, A. Citogenética vegetal enfatizando a família orchidaceae. **Orchidstudium: International Journal of Orchid Study**, Poços de Caldas, v. 1, p. 26-54, 2006.
- MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* L. (Leguminosae-Papilionoideae) by chromosome banding and *in situ* hybridization of rDNA 45S and 5S. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 65-72. 2007.
- MOSCONE, E. A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M.; FUCHS, J.; SCHWEIZER, D. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 1224-1233, 1999.
- NARANDER, T.; SHWETA; TANVIR, K.; SRINIVASA RAO, M.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S. K. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 15, p. 2453–2455, 2005.
- NAVASHIN, M. Changes in number and form of chromosomes as a result of hybridization. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, Viena, v. 6, p. 195–223, 1927.
- NAVRÁTILOVÁ, A.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Karyotype analysis of four *Vicia* species using *in situ* hybridization with repetitive sequences. **Annals of Botany**, Londres, v. 91, p. 921-926, 2003.
- NEUMANN, P.; NOUZOVÁ, M.; MACAS, J. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 716-728, 2001.
- OLIVEIRA, A.L.P.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tóquio, v. 64, p. 164-174, 1999.
- PALOMINO, G.; VÁZQUEZ, R. Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, Tóquio, v. 56, p. 343-351, 1991.
- PANDO, L. A.; CARVALHO, D. D. de; TOYAMA, M. H.; CIERO, L. di; NOVELLO, J. C.; PASCHOLATTI, S. F.; MARANGONI, R. Purification and Characterization of a Lectin from *Crotalaria paulina* Seeds. **The Protein Journal**, Nova Iorque, v. 23, p. 437-444, 2004.
- PEDROSA-HARAND, A.; ALMEIDA, C. C. S. de; MOSIOLEK M.; BLAIR M. W.; SCHWEIZER, D; GUERRA, M. Extensive ribosomal DNA amplification during common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova Iorque, v. 112, p. 924-933, 2006.

- PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance and silencing of transcription **Trends in Plant Science**, Londres, v. 4, p. 478-483, 1999.
- PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance **Trends in Genetics**, Londres, v. 16, p. 495-500, 2000.
- POLHILL, R. M. Miscellaneous notes on African species of *Crotalaria*: II. **Kew Bulletin**, Londres, v. 22, p. 169-348, 1968.
- POLHILL, R. M. Papilionoideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.) **Advances in legume Systematics**. Londres: Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. pt. 1, chap.1, p. 191-208.
- POLHILL, R.M. **Crotalaria in Africa and Madagascar**. Rotterdam: Royal Botanic Gardens, Kew, 1982. 389p.
- RAINA, S.N.; MUKAI, Y.; KAWAGUCHI, K.; GOEL, S.; JAIN, A. Physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova Iorque, v. 103, p. 839-845, 2001.
- RAINA, S.N.; VERMA, R.C. Cytogenetics of *Crotalaria*. I. Mitotic complements in twenty species of *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tóquio, v. 44, p. 365-375, 1979.
- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 12, p. 153-161, 2004a.
- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO E. Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA clusters variability in natural populations. **Proceedings National Academy Sciences of the United States of América**, Nova Iorque, v. 101, n. 41, p. 14818-14823, 2004b.
- RUAS, C. F.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Chromosome evolution in the genus *Mikania* (Compositae). **American Journal of Botany**, Ohio, v. 84, p. 1156-1163, 1997.
- RUAS, C. F.; VANZELA, A. L. L.; SANTOS, M. O.; FREGONEZI, J. N.; RUAS, P. M.; MATZENBACHER, N. I.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hipochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 129-139, 2005.
- SCHUBERT, I. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae s. lat.)? – Inferences from specificity of silver staining. **Plant Systematic and Evolution**, Wien, v. 144, p. 291-305. 1984.
- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, Nova Iorque, v. 92, p. 143-148, 1985.

SCHWARZACHER, T.; SCHWEIZER, D. Karyotype analysis and heterochromatin Differentiation with Giemsa (J-Banding and Fluorescent Counterstaining in *Cephalanthera* (Orchidaceae). **Plant systematic and Evolution**, Wien, v. 141, p. 91-113, 1982.

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

SCHWEIZER, D. Counterstain-enhanced chromosome banding. **Human Genetics**, Nova Iorque, v. 57, p. 1-14, 1981.

SHISHIDO, R.; SANO, Y.; FUKUI, K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. **Molecular and General Genetics**, Nova Iorque, v. 263, p. 586-591, 2000.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2nd ed., Londres: Boca Raton CRC Press, 2002. 463p.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Londres: Edward Arnold, 1971. 216p.

SWANSON, C. P. **Cytogenetics: the chromosome in division, inheritance, and evolution**. 2nd ed., Nova Jersey: Prentice-Hall, 1981. 577p.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. New York: Springer-Verlag, 1992. 469p.

TAPIA-PASTRANA, F.; GALLEGOS-PACHECO, E.; TEODORO-PARDO, C.; MERCADO-RUARO, P. New cytogenetic information of two mexican populations of *Crotalaria incana* L.(Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, Tóquio, v. 70, n. 2, p. 207-212, 2005.

UNIV HOSEO ACADEMIC COOP FOUND (Uyho). Seong, H. J.; Koh, S. B.; Kim, T. S.; Park, H. W.; Park, C. G.; Kim, J. S.; Kang, M. H. **Composition for preventing and treating large intestine cancer without side effects comprising extract of *Crotalaria sessiflora* L. with antioxidizing, anticancer and immune function-promoting activities** KR 2007036099-A. 26 fev. 2007. 02 abr. 2007.

VAUGHAN, H. E.; JAMILENA, M.; REJON R. C.; PARKER J. S.; GARRIDO-RAMOS M. A. Loss of nucleolus-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. **Heredity**, Londres, v. 71, p. 574-580, 1993.

VENKATESWARLU, K.; LEE, S. W.; NAZAR, R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA encoding genes. **Gene**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 249-253, 1991.

VERMA, R. C.; KESAVACHARYULU, K.; RAINA, S. N. Cytogenetics of *Crotalaria*. IX. Mitotic complements in 19 species. **Cytologia**, Tóquio, v. 49, p. 157-169, 1984.

VERMA, R. C.; RAINA, S. N. Cytogenetics of *Crotalaria*. II. Male meiosis in 8 species of *Crotalaria*. **Cytologia**, Tóquio, v. 45, p. 297-306, 1980.

VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P. S. M. A cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, Tóquio, v. 58, p. 305-311, 1993.

VOSA, C. G. A revised cytotaxonomy of the genus *Tulbaghia* (Alliaceae). **Caryologia**, Florência, v. 53, p. 83-112. 2000.

VOSA, C. G.; PERRY, P. L.. On the cytotaxonomy of the genus *Eriospermum* Jacq. ex. Willd. (Eriospermaceae). **Caryologia**, Florência, v. 52, p. 117-125, 1999.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 225–249, 2000.

WINDLER, D. Chromosome number for native North American unifoliate species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Brittonia**, Nova Iorque, v. 26, p. 172-176, 1974.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oats (Poaceae: Aveneae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 155, p. 193-210, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Comprimento relativo (%) e tamanho (µm) dos braços curto e longo dos pares cromossômicos nas espécies de *Crotalaria*

Espécies	Cromossomos															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	BC	BL	BC	BL	BC	BL	BC	BL	BC	BL	BC	BL	BC	BL	BC	BL
Comprimento relativo																
<i>C. lanceolata</i>	6,83	7,38	7,09	7,52	6,16	7,60	5,26	7,58	4,59	7,42	5,01	6,42	4,13	6,60	4,22	4,92
	±0,39	±1,24	±0,48	±0,40	±0,33	±0,42	±0,35	±0,34	±0,38	±0,35	±0,26	±0,37	±0,18	±0,43	±0,60	±0,53
<i>C. ochroleuca</i>	7,44	7,98	6,06	8,2	6,48	7,45	5,39	8,06	5,81	6,84	4,53	6,31	4,77	5,22	3,87	5,38
	±0,22	±0,41	±0,42	±0,44	±0,19	±0,12	±0,23	±0,44	±0,36	±0,31	±0,26	±0,29	±0,21	±0,23	±0,27	±0,40
<i>C. pallida</i>	7,97	9,36	6,64	7,96	5,11	8,69	5,00	7,56	4,00	7,80	4,94	6,37	4,55	5,79	4,13	4,79
	±0,59	±0,31	±0,27	±0,39	±0,59	±0,21	±0,57	±0,56	±0,25	±0,39	±0,36	±0,21	±0,39	±0,35	±0,23	±0,16
<i>C. macronata</i>	7,07	9,78	6,91	7,71	5,47	8,11	5,09	7,37	4,53	7,19	5,16	6,02	4,43	6,23	4,05	5,05
	±0,49	±0,40	±0,34	±0,25	±0,36	±0,40	±0,58	±0,43	±0,44	±0,44	±0,25	±0,25	±0,28	±0,37	±0,41	±0,40
<i>C. striata</i>	7,26	9,18	6,59	7,93	5,75	7,68	4,65	7,69	4,99	6,89	4,37	6,85	4,92	6,06	4,04	4,90
	±0,53	±0,41	±0,28	±0,59	±0,53	±0,45	±0,36	±0,24	±0,31	±0,38	±0,27	±0,64	±0,19	±0,25	±0,35	±0,27
Tamanho dos braços																
<i>C. lanceolata</i>	1,62	1,76	1,66	1,76	1,44	1,78	1,21	1,74	1,06	1,70	1,16	1,49	0,95	1,51	0,95	1,11
	±0,14	±0,32	±0,20	±0,19	±0,14	±0,16	±0,19	±0,21	±0,20	±0,19	±0,12	±0,22	±0,12	±0,17	±0,13	±0,12
<i>C. ochroleuca</i>	1,68	1,79	1,35	1,83	1,47	1,69	1,18	1,77	1,29	1,52	1,01	1,41	1,07	1,16	0,86	1,20
	±0,26	±0,20	±0,22	±0,28	±0,21	±0,21	±0,19	±0,26	±0,16	±0,18	±0,15	±0,22	±0,17	±0,16	±0,14	±0,20
<i>C. pallida</i>	1,82	2,14	1,49	1,79	1,17	2,00	1,11	1,67	0,88	1,72	1,09	1,41	1,03	1,30	0,92	1,06
	±0,17	±0,21	±0,16	±0,23	±0,12	±0,14	±0,16	±0,17	±0,11	±0,18	±0,09	±0,14	±0,15	±0,16	±0,12	±0,11
<i>C. macronata</i>	1,42	1,96	1,36	1,54	1,08	1,60	1,02	1,46	0,90	1,44	1,04	1,21	0,91	1,27	0,81	1,01
	±0,16	±0,13	±0,12	±0,15	±0,11	±0,19	±0,13	±0,16	±0,09	±0,14	±0,07	±0,07	±0,06	±0,11	±0,10	±0,10
<i>C. striata</i>	1,52	1,92	1,39	1,68	1,20	1,61	0,97	1,61	1,04	1,44	0,91	1,43	1,03	1,26	0,84	1,03
	±0,15	±0,09	±0,07	±0,12	±0,12	±0,13	±0,09	±0,06	±0,07	±0,10	±0,07	±0,11	±0,06	±0,06	±0,09	±0,09