

KLENYA ROSA ROCHA BRAGA

**“ESTUDOS CAROTÍPICOS EM ASTERACEAE DA RESERVA BIOLÓGICA
MUNICIPAL (RBM) SERRA DO JAPI (SP)”**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KLENYA ROSA ROCHA BRAGA

**“ESTUDOS CAROTÍPICOS EM ASTERACEAE DA RESERVA
BIOLÓGICA MUNICIPAL (RBM) SERRA DO JAPI (SP)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Klenya Rosa Rocha Braga

Eliana R Forni Martins

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B73e Braga, Klenya Rosa Rocha, 1978
Estudos cariotípicos em Asteraceae da Reserva Biológica Municipal (RBM)
Serra do Japi (SP) / Klenya Rosa Rocha Braga. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
Orientador: Eliana Regina Forni Martins.
BraTese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Asteraceae - Japi, Serra do (SP). 2. Citogenética. 3. Número cromossômico.
4. Cariótipos. 5. Bandamento cromossômico. 6. Hibridização in situfluorescente.
I. Forni-Martins, Eliana Regina, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Karyotypic studies in Asteraceae from the Municipal Biological Reserve (MBR) of Japi mountain range (SP)

Palavras-chave em inglês:

Asteraceae - Japi Mountains (Brazil)

Cytogenetics

Chromosome numbers

Karyotypes

Chromosome banding

In situhybridization, fluorescence

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Eliana Regina Forni Martins [Orientador]

André Olmos Simões

Ricardo Augusto Lombello

João Semir

Nair Dahmer

Data de defesa: 09-09-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 09 de setembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (orientadora)



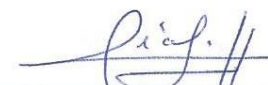
Assinatura

Profa. Dra. Nair Dahmer



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello



Assinatura

Prof. Dr. João Semir



Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões



Assinatura

Profa. Dra. Carolina do Amaral Polido

Assinatura

Dra. María Victoria Romero

Assinatura

Dra. Luana Olinda Tacuatia

Assinatura

Dedico aos meus queridos pais: Paulo e Teresinha
pelo carinho, amor, apoio e incentivo.

“O somatório de todos estes fatores (posição geográfica, paisagens, composição florística, variação topográfica e climática) realça a enorme importância das florestas da Serra do Japi em termos de preservação ambiental e banco genético”.

(Hermógenes de F. Leitão-Filho)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, por Seu Amor, Misericórdia e Graça.

Aos meus pais Paulo e Teresinha; aos meus irmãos Clay, Kayla, Clayber e Marquinhos; ao meu cunhado Agnaldo e aos meus queridos sobrinhos Sophie e Pietro, pelo carinho, apoio, amizade e amor.

À família em Cristo - Igreja Batista em Real Parque por me receber com tanto carinho e por todos os momentos de comunhão, compartilhamento, orações e apoio.

À república cristã “Casa da Martinha” pelo acolhimento, respeito, amizade e orações.

Ao GDC – Grupo de Discussão Cristã do IB/Unicamp pelos momentos de debates, compartilhamentos, amizade e orações.

Aos meus amigos, colegas e familiares pelo carinho, apoio e torcida.

À Prof^{ra} Dr^a Eliana Regina Forni-Martins pela disposição em aceitar o encargo de ser minha orientadora e por toda sua atenção, ajuda e paciência a mim dispensada.

À colaboração dos taxonomistas Prof. Dr. João Semir e ao pesquisador Marcelo Monge pela identificação de todas as espécies de Asteraceae estudadas nesse trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. André Olmos Simões, ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello, e à Dr^a Vanessa Oliveira-Maekawa pelas contribuições dadas ao projeto de pesquisa na ocasião da qualificação.

À minha pré-banca de defesa: Prof. Dr. André Olmos Simões, Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello e à Dr^a Maria Victoria Romero pelas sugestões que muito contribuíram para construção da versão final do texto da tese.

Aos professores e pesquisados da minha banca de defesa: Prof. Dr. André Olmos Simões, Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello, Prof. Dr. João Semir, Prof(a). Dr(a) Nair Dahmer,

Dr(a) Maria Victoria Romero, Prof(a). Dr(a) Caroline do Amaral Polido e Dr(a) Luana Olinda Tacuatiá por terem aceito o convite para compor a banca.

Ao Departamento de Botânica /IB/Unicamp e ao Laboratório de Biossistemática pela estrutura oferecida.

Aos meus colegas da citogenética: Nair Dahmer, Vanessa Oliveira-Maekawa, Caroline Polido, Ana Paula Moraes, Rafael Pinto, Maria Victoria Romero, Luana Tacuatiá, Thaíssa Engel e João Paulo Nasário pelo companherismo e por compartilhar experiências durante o tempo em que estivemos juntos.

Às instituições de fomento CAPES, CNPq, FAEPEX/UNICAMP pelo apoio, e à FAPEMA pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Botânica /IB/Unicamp pelo apoio e contribuição para minha formação profissional, em especial à Maria Roseli por toda assistência nas questões burocráticas do curso.

À Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente do município de Jundiaí por me autorizar coletar na Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi.

Ao Prof. Dr. João Vasconcelos-Neto pelo apoio e incentivo à pesquisa na Serra do Japi.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
Citogenética: técnicas e aplicações	9
Estudos citogenéticos em Asteraceae	14
Serra do Japi-SP	16
OBJETIVOS	22
ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 1: Características cariotípicas em espécies de Asteraceae da Serra do Japi-SP	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	36
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Área de estudo.....	37
Espécies estudadas	38
Germinação de sementes, pré-tratamento, fixação e armazenamento	40
Técnica de coloração de Giemsa.....	40
Tamanho cromossômico, comprimento total da cromatina – CTC e elaboração do ideograma	40
RESULTADOS	41
Número cromossômico	41
Tamanho cromossômico e comprimento total da cromatina - CTC.....	42
Ideogramas	42
DISCUSSÃO..	53
Tribo Eupatorieae.....	55
Tribo Vernonieae	57

Tribo Astereae.....	61
Tribo Cichorieae	62
Tribo Coreopsideae	63
Tribo Mutisieae.....	64
Demais tribos: Gnaphalieae, Gochnatieae, Helenieae, Inuleae, Nassauvieae, Neuroleneae, Senecioneae e Tageteae	65
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
CAPÍTULO 2: Bandamento CMA+/DAPI- e FISH em espécies de Asteraceae da Serra do Japi-SP	79
RESUMO.....	80
ABSTRACT	81
INTRODUÇÃO	82
MATERIAIS E MÉTODOS	84
Pré-tratamento e preparação de lâminas com digestão enzimática.....	84
Bandamento CMA/DAPI	85
Técnica de Hibridização <i>in situ</i> - FISH.....	86
Observação das lâminas e registro dos resultados	87
RESULTADOS	87
Bandamento CMA/DAPI.....	87
Distribuição de DNAr 5S e 45S	88
DISCUSSÃO	89
Bandamento CMA/DAPI	89
Hibridização <i>in situ</i> FISH	90
CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Introdução

Figura 01	Sistema de Classificação de Bremer (1996) para subfamílias e tribos de Asteraceae	7
Figura 02	Sistema de Classificação de Panero & Funk (2002) para subfamílias e tribos de Asteraceae	8
Figura 03	Sistema de Classificação de Funk <i>et al.</i> (2009) para subfamílias e tribos de Asteraceae.	9
Figura 04	Principais etapas da técnica de hibridização <i>in situ</i> (FISH). A marcação da sonda (a) ; é feita independente da preparação da lâmina (b) . Em seguida, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados (c, d) e, quando colocados em contato, a sonda hibridização <i>in situ</i> (e) com o DNA-alvo. A sonda marcada pode ser detectada por anticorpos ligados a fluorocromos (f) e visualizada diferencialmente ao microscópio (g) . Reproduzido de Guerra (2004)..	13
Figura 05	Representação da estrutura do DNAr 45S e 5S. Créditos: JD. Urdampilleta.....	14
Figura 06	Visão geral da Serra do Japi, município de Jundiaí-SP (foto - Ronaldo Pereira)	18
Figura 07	Mapa da Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi: a) Brasil, b) Estado de São Paulo, c) trilhas da Serra do Japi (detalhe em vermelho) (Paro <i>et al.</i> , 2012). Adaptado.....	19
Figura 08	Alguns representantes de Asteraceae amostradas na Serra do Japi-SP: a- <i>Achyrocline saturioides</i> (Lam.) DC., b- <i>Critonia megaphylla</i> (Baker) R.M. King & H. Rob., c- <i>Calea pinatifida</i> (R. Br.) Less., d- <i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC., e- <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg, f- <i>Trichogoniopsis adenata</i> (DC.) R.M. King & H. Rob., g- <i>Trixis antmenhorea</i> (Schrank) Kuntze (Fotos: Marcelo Monge), h- <i>Youngia japonica</i> (Lam.) DC., i- <i>Heterocondilus alatus</i> (Vell.) R.M. King & H. Rob. (Fotos: João Vasconcelos)	20
Capítulo 01		
Figura 01	Metáfases mitóticas de espécies de Astereceae, pertencentes à tribo Eupatorieae: a) <i>Austroeupatorium sp.</i> (2n=40), b) <i>Chromolaena odorata</i> (2n=30), c) <i>Critonia megaphylla</i> (2n=20), d) <i>Grazielia intermedia</i> e) <i>Heterocondylus alatus</i> (2n=30), f) <i>H. vitalbae</i> (2n=40), g) <i>Mikania sp</i> (2n=34), h) <i>Praxelis kleineoides</i> (2n=30), i) <i>Trichogoniopsis adenantha</i> (2n=20). Coloração por Giemsa. Barra= 10µm	45
Figura 02	Metáfases mitóticas de espécies de Astereceae, pertencentes às tribos Vernonieae (a-f) e Cichorieae (g-i) : a) <i>Elephantopus angustifolius</i> (2n=22), b) <i>Vernonia diffusa</i> (3n=34), c) <i>V. hilariana</i> (2n=34), d) <i>V. polyanthes</i> (2n=34), e) <i>V. remotiflora</i> (2n=28), f) <i>V. platensis</i> (2n=60), g) <i>Sonchus oleraceus</i> (2n=32), h) <i>Taraxacum officinale</i> (2n=26), i) <i>Youngia japonica</i> (2n=16). Coloração por	

	Giemsa. Barra= 10µm.....	46
Figura 03	Metáfases mitóticas de espécies de Astereaceae, pertencentes às tribos Astereae (a-e), Coreopsidae (f-g) e Mutisieae (h-i): a) <i>Baccharis anomala</i> (2n=18), b) <i>B. dracunculifolia</i> (2n=18), c) <i>B. punctulata</i> (2n=18), d) <i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (2n=54), e) <i>Symphyotrichum squamatum</i> (2n=20), f) <i>Bidens pilosa</i> (2n=72), g) <i>B. subalternans</i> (2n=72), h) <i>Chaptalia interregima</i> (2n=48), i) <i>C. nutans</i> (2n=50). Coloração por Giemsa. Barra= 10µm.....	47
Figura 04	Metáfases mitóticas de espécies de Astereaceae: a) <i>Achyrocline satuerioides</i> (2n=28), b) <i>Calea pinnatifida</i> (2n=38), c) <i>Erechtites valerianifolius</i> (2n=40), d) <i>Gochnatia barrosii</i> , e) <i>Porophyllum ruderales</i> , f) <i>Pterocaulon alopecuroides</i> (2n=20), g) <i>Tagetes minuta</i> (2n=48), h) <i>Trixis antimenorrhoea</i> (2n=54). Coloração por Giemsa. Barra= 10µm	48
Figura 05	Comprimento total da cromatina (CTC) de espécies de Asteraceae das tribos: a) Eupatorieae (9spp.), b) Vernonieae (6spp.) e c) Astereae (5spp.)	49
Figura 06	Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes à tribo Eupatorieae : a) <i>Chromolaena odorata</i> (2n=30); b) <i>Grazielia intermedia</i> (2n=20); c) <i>Mikania sp</i> (2n=34); d) <i>Praxelis kleineoides</i> (2n=30); e) <i>Trichogoniopsis adenantha</i> (2n=20). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1µm	50
Figura 07	Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes à tribo Cichorieae (a-b) e Astereae (c-e): a) <i>Sonchus oleraceus</i> (2n=32); b) <i>Taraxacum officinale</i> (2n=26); c) <i>Baccharis dracunculifolia</i> (2n=18); d) <i>B. punctulata</i> (2n=18); e) <i>Symphyotrichum squamatum</i> (2n=20) (seta indicando satélite). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1µm.	51
Figura 08	Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes tribo Vernonieae (a), Inuleae (b), Tageteae (c) e Nassauvieae (d): a) <i>Vernonia hilariana</i> (2n=34); b) <i>Pterocaulon alopecuroides</i> (2n=20); c) <i>Tagetes minuta</i> (2n=48); d) <i>Trixis antimenorrhoea</i> (2n=54). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1µm.....	52
Figura 09	Árvore filogenética da tribo Eupatorieae (Ito <i>et al.</i> , 2000; Robinson <i>et al.</i> (2009). Detalhe em vermelho, gêneros amostrados no presente estudo cromossômico e valores de número básico foram acrescidos, de acordo com Robinson <i>et al.</i> (2009). Adaptado.....	57
Figura 10	Fiologenia da tribo Vernonieae - construída a partir na Análise Bayesiana de conjuntos combinados de sequências de DNA de STI, ndhF, trnL-F para 90 taxons de Vernonieae (Keeley <i>et al.</i> 2007; Keeley, & Robinson, 2009). Os valores de número básico foram acrescidos, de acordo com Keeley, & Robinson (2009). Os ramos de cor cinza indicam representantes do Velho Mundo e os demais ramos se referem a ocorrências no continente americano. Adaptado....	60
Capítulo 02		
Figura 01	Bandamento CMA ⁺ em Asteraceae: a) <i>Mikania sp</i> (2n=34), b)	

	<i>Praxelis kleineoides</i> (2n=30), c) <i>Trichogoniopsis adenantha</i> (2n=20), d) <i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (2n=ca. 54), e) <i>Symphyotrichum squamatum</i> (2n=20), f) <i>Sonchus oleraceus</i> (2n=32). Setas azuis CMA ⁺ . Barra branca = 10µm 93
Figura 02	Bandamento CMA ⁺ em Asteraceae: a) <i>Vernonia polyanthes</i> (2n=34), b) <i>V. remotiflora</i> (2n=28), c) <i>V. diffusa</i> (2n=34), d) <i>Pterocaulon alopecuroides</i> (2n=20) e) <i>Bidens pilosa</i> (2n=72), f) <i>B. subalternans</i> (2n=72). Setas azuis CMA ⁺ . Barra branca = 10µm..... 94
Figura 03	Bandamento CMA ⁺ em Asteraceae: a) <i>Chaptalia interregima</i> (2n=ca.48), b) <i>Trixis antimenorrhoea</i> (2n=54), c) <i>Calea pinnatifida</i> (2n=38), d) <i>Tagetes minuta</i> (2n=48). Setas azuis CMA ⁺ . Barra branca = 10µm 95
Figura 04	Técnica de FISH em Asteraceae: a) <i>Vernonia remotiflora</i> (2n=28), b) <i>V. diffusa</i> (2n=34), c) <i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (2n=ca.54), d) <i>Bidens pilosa</i> (2n=72), e) <i>Mikania sp</i> (2n=34). As setas amarelas indicam sítios DNAr 45S e as setas brancas indicam sítios DNAr 5S. Barra branca = 10µm 96
Figura 05	Figura 05 – Metáfases encontradas em cinco espécies de Asteraceae a partir da aplicação da técnica de FISH: a) <i>Vernonia remotiflora</i> (2n=28), b) <i>V. diffusa</i> (2n=34), c) <i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (2n=ca.54), d) <i>Bidens pilosa</i> (2n=72), e) <i>Mikania sp</i> (2n=34). As faixas contínuas e pontos em vermelhos representam sítios de DNAr 5S e as faixas contínuas verdes representam sítios DNAr de 45S. 97

RESUMO

A família Asteraceae (Compositae) possui cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros. Sua distribuição é cosmopolita, com representantes em todos os continentes. Sua maior diversidade está na América do Sul. A família está bem representada no Brasil (cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies), ocorrendo principalmente em formações abertas, como cerrados e campos. Cassini, em 1817 foi o primeiro a propor um sistema de classificação para a família, que foi alterado por vários autores. Atualmente a família está dividida 12 subfamílias e 43 tribos. Dentre os parâmetros que podem ser obtidos a partir de estudos citogenéticos, o número cromossômico é o mais amplamente utilizado. Estima-se que cerca de 61,6% dos gêneros de Asteraceae possuem pelo menos uma contagem de números cromossômicos, sendo relatada grande variação ($2n=4$ a ca. 432). O número básico $x=9$ é o mais frequente. Apesar do número considerável de trabalhos referentes à contagem cromossômica e análise de cariótipos de espécies de Asteraceae, este número ainda é muito pequeno quando comparado com a riqueza de espécies da família. No que diz respeito aos estudos cromossômicos utilizando bandamento cromossômico e hibridização de DNA *in situ*, os trabalhos são mais escassos. Diante da riqueza de espécies, da diversidade cariotípica da família e da carência de dados citogenéticos para subsidiar a reavaliação das delimitações de seus grupos taxonômicos, este trabalho objetivou caracterizar o cariótipo de diversas espécies nativas de Asteraceae proveniente da Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi uma das últimas grandes áreas de floresta contínua do Estado de São Paulo, que apresenta uma grande diversidade de espécies de Asteraceae. Foram feitas a determinação do número cromossômico, o detalhamento de caracteres morfológicos dos cromossomos (tamanho e forma) e a aplicação de técnicas de bandamento CMA/DAPI e técnica de FISH. Foi determinado o número cromossômico de 35 espécies, as quais estão distribuídas em 14 tribos e 26 gêneros, com variação de $2n=16$ a 72. As tribos mais bem representadas foram Eupatorieae (9spp.), Vernonieae (6spp.) e Astereae (5spp.). Seis novas contagens foram determinadas e quatro divergiram de relatos anteriores: *Bidens subalternans* ($2n=72$), *Chromolaena odorata* ($2n=30$), *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) e *Vernonia diffusa* ($2n=34$). Os cariótipos podem ser considerados moderadamente simétricos, com o índice TF% variando de 29 em *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) a 44 em *G.*

intermedia ($2n=20$). Dezesesseis espécies foram submetidas à técnica de bandamento CMA/DAPI. Houve variação de 2 a 12 bandas CMA⁺/DAPI⁻. A técnica de FISH revelou diferenças cariotípicas em cinco espécies estudadas: *Conyza sumatrensis* var. *leotheca*, *Bidens pilosa*, *Mikania* sp, *Vernonia diffusa* e *V. remotiflora*, que apresentaram 2 a 6 sítios de DNAr 45S e 2 a 3 sítios de DNAr 5S. Nossos dados de bandamento CMA/DAPI e FISH são inéditos para todas as espécies estudadas.

Palavras-chave: Asteraceae, Serra do Japi, citogenética, número cromossômico, cariótipos, bandamento cromossômico, hibridização in situfluorescente.

ABSTRACT

The Asteraceae family (Compositae) comprises around 23.000 species and 1.600 genera. Its distribution is comopolitan, with representatives in all continents. The highest diversity is found in South America. The family is well represented in Brazil (with 300 genera and 2.000 species), mainly occurring in the opened formations, like savannas and fields. Cassini, in 1817 was the first to propose a system of classification for the family, which was later changed by several authors. Nowadays the family is divided in 12 subfamilies and 43 tribes. Among the parameters that can be obtained from cytogenetic studies, the number of chromosomes is the most commonly used. Its estimated that about 61,6% of Asteraceae genera have at least a count chromosome numbers, being reported wide variation ($2n=4$ a ca. 432). The basic number $x=9$ is the most frequent. In spite of considerable number of works on the chromosomal count and karyotype analysis from species of Asteraceae, this number is still very small when compared with species richness within the family. In respect of chromosomal studies used in the chromosome banding and *in situ* DNA hybridization, the works are more scarce. Before wealth of species, of karyotype diversity of family and of lack of data cytogenetics to subsidize the revaluation of delimitations of its taxonomic groups, this work aims to characterize the karyotype of several native species of Asteraceae from the Municipal Biological Reserve (MBR) of Japi, one of the last large areas of continuous forest of São Paulo, that has a great diversity of species of Asteraceae. We determined the chromosomal number, detailing the morphological characters of chromosomes (size and shape), and applied techniques of CMA/DAPI banding and FISH. We determined the chromosome number of 35 species, which are distributed in 14 tribes and 26 genera, ranging from $2n=16-72$. The most well represented tribes were Eupatorieae (9spp.), Vernonieae (6spp.) and Astereae (5spp.). Six new counts were determined and four differed from previous scores: *Bidens subalternans* ($2n=72$), *Chromolaena odorata* ($2n=30$), *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) and *Vernonia diffusa* ($2n=34$). The karyotypes can be considered moderately symmetric, with index TF% ranging from 29 in *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) to 44 in *G. intermedia* ($2n=20$). Sixteen species were submitted to technique of banding CMA/DAPI. There were variations of 2 to 12 CMA⁺/DAPI bands. The technique of FISH revealed varied karyotypes in five species: *Conyza sumatrensis* var. *leotheca*, *B.*

pilosa, *Mikania sp*, *Vernonia diffusa* and *V. remotiflora* showed 2 to 6 sites of 45S rDNA and 2 to 3 sites of 5S rDNA. Our data of banding CMA/DAPI and FISH are original for all studied species.

Keywords: Asteraceae, Japi Mountains, Cytogenetics, Chromosome numbers, Karyotypes
Chromosome banding, *In situ* hybridization fluorescence

INTRODUÇÃO GERAL

A família Asteraceae Brencht & J. Presl (Compositae) possui cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros, o que a torna a maior família do grupo das eudicotiledôneas e a principal família da ordem Asterales. Sua distribuição é cosmopolita, com representantes em todos os continentes, com exceção do Antártico. Sua maior diversidade está na América do Sul. A família está bem representada no Brasil, com cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies, ocorrendo principalmente em formações abertas como cerrados e campos. Contudo, encontramos Asteraceae em ambientes de florestas (Bremer, 1994; Souza & Lorenzi, 2005; Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2014).

As Asteraceae se caracterizam por apresentar plantas de hábito herbáceo ou subarbustos, e mais raramente arbustos, pequenas árvores e lianas; as folhas são alternas, menos frequentemente opostas e verticiladas. A inflorescência é do tipo capítulo, o qual é envolvido por brácteas que formam um involúcro; as flores são todas iguais entre si ou diferenciadas em flores do raio (as mais externas) e flores do disco (as mais internas); as flores do raio são em geral, estéreis, enquanto que as flores do disco são bissexuais ou unissexuais; o cálice é fortemente transformado em papilho cerdoso ou plumoso. (Souza & Lorenzi, 2005; Judd *et al.*, 2009). Seu fruto é do tipo cipsela, fruto indescendente, unilocular, com uma única semente não fundida ao pericarpo, oriundo de um ovário ínfero (Marzinek *et. al.*, 2008).

Em relação à importância econômica de Asteraceae, há espécies utilizadas para os mais variados fins, a citar, ornamentais (*Leucanthemum vulgare*, *Gazania rigens* e *Zinnia elegans*), bebidas como chá (*Matricaria recutita*), alimento (*Lactuca sativa*), corante (*Carthamus tinctorius*), na produção de adoçante (*Inula helenium*, *Stevia rebaudiana*), importância medicinal (*Baccharis trimera*), na produção de inseticida (*Tanacetum cinerariifolium*), como especiarias (*Chrysanthemum*) e, como matéria prima para produção de borracha (*Parthenium argentatum*)(Simpson, 2009).

Segundo King *et al.* (1995 a,b), Cassini pode ser apontado como o primeiro a propor um sistema de classificação para a família, em virtude das inúmeras contribuições para as Compositae, totalizando 65 trabalhos e mais algumas revisões publicadas no

período de 1812 a 1821 no “Bulletin des Sciences par la Société Philomatique” de Paris. Em seu sistema, Cassini propôs 20 tribos. Posteriormente vários autores propuseram novos sistemas de classificação, alterando a organização interna da família, como Lessing (1832), De Candolle (1836), Hofmann (1890) e Jeffrey (1978).

Bremer (1994), com base em dados morfológicos (como caracteres dos papus e ramos do estilete) e em algumas sinapomorfias, como por exemplo, presença de brácteas (Heliantheae) e perda de papus (Calenduleae), subdividiu a família em três subfamílias e 17 tribos, a saber, subfamília Barnadesioideae (tribo Barnadesieae); subfamília Cichorioideae (tribos Mutisieae, Cardueae, Lactuceae, Vernonieae, Liabeae e Arctoteae); e subfamília Asteroideae (tribos Inuleae, Plucheae, Gnaphalieae, Calenduleae, Astereae, Anthemideae, Senecione, Helinieae, Heliantheae e Eupatorieae). Posteriormente, Bremer (1996), com base em dados morfológicos (vegetativos e reprodutivos), reconheceu quatro subfamílias: Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae (Figura 01).

Mais recentemente, Panero & Funk (2002) propuseram um novo sistema de classificação a partir do uso combinado de marcadores moleculares de sequências de DNA de cloroplasto (cpDNA) (*ndhF*, *rbcL*) (Figura 02), subdividindo a família em 11 subfamílias e 35 tribos. As subfamílias são: Barnadesioideae, Mutisioideae, Gochnatioideae, Hecastocleidoideae, Carduoideae, Pertyoideae, Gymnarrhenioideae, Cichorioideae, Corymbioideae, Asteroideae e “grupo *Siftitia*”. Posteriormente, Panero & Funk (2008), com base em novos dados moleculares de cpDNA (*ndhF*, *trnL-trnF*, *matK*, *ndhD*, *rbcL*, *rpoB*, exon 1 de *rpoC*, 23S-*trnA* e *ndhI*) elevaram *Siftitia* e *Wunderlichia* a novas subfamílias, Stiffitioideae e Wunderlichioideae, respectivamente. Finalmente, Funk *et al.* (2009) dividiram a família em 12 subfamílias e 43 tribos (Figura 03).

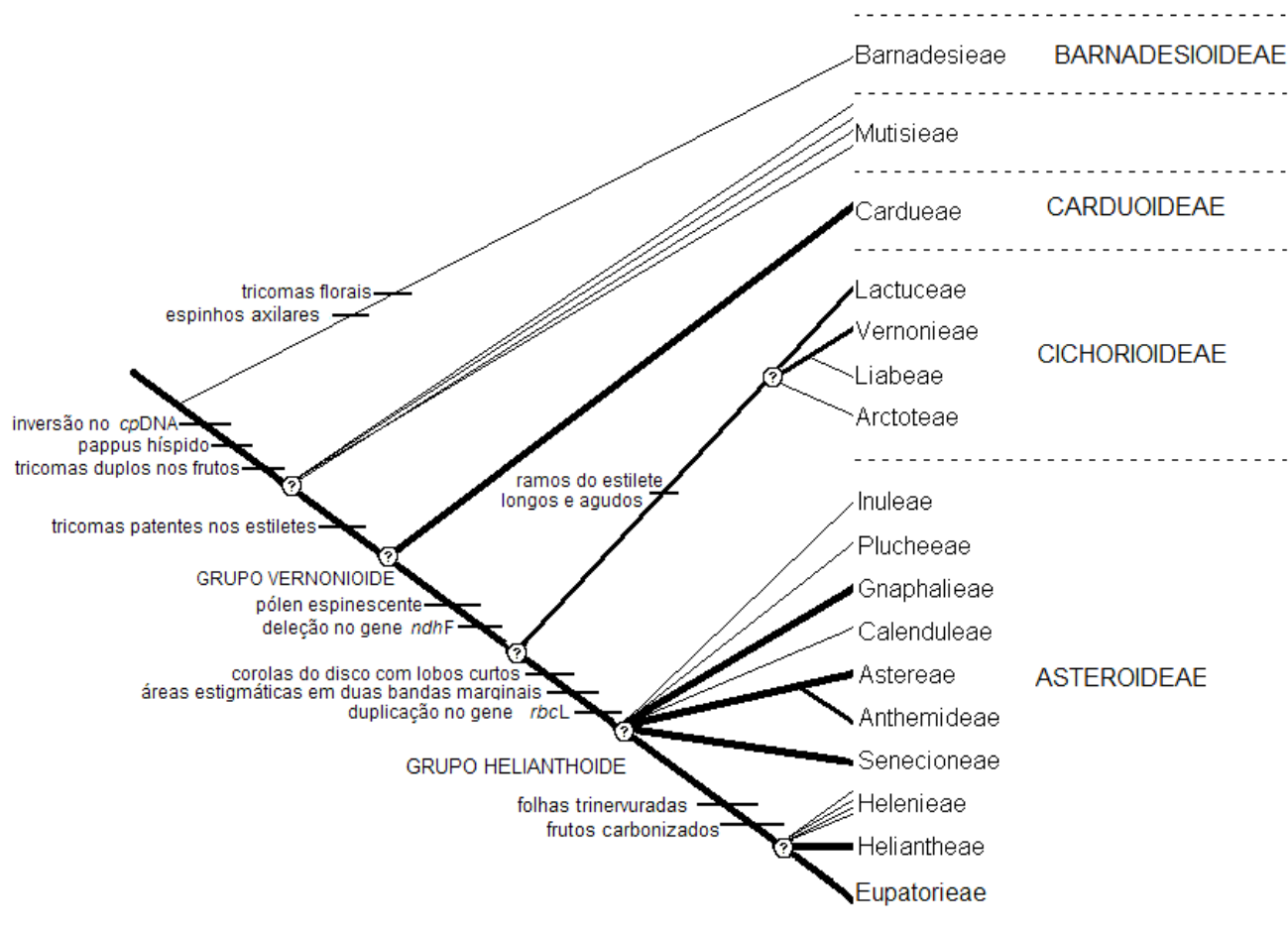


Figura 01 - Sistema de Classificação de Bremer (1996) para subfamílias e tribos de Asteraceae.

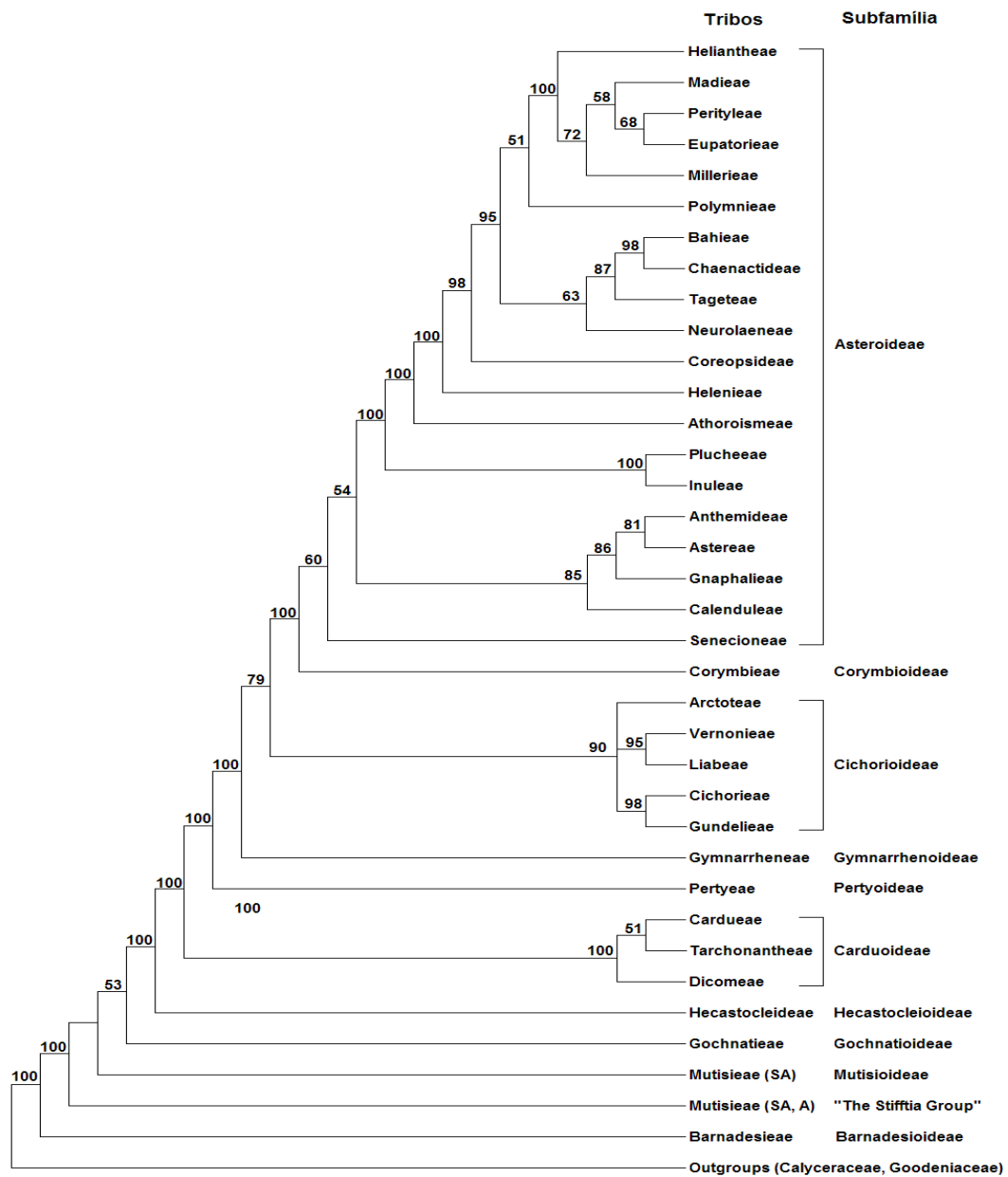


Figura 02 - Sistema de Classificação de Panero & Funk (2002) para subfamílias e tribos de Asteraceae.

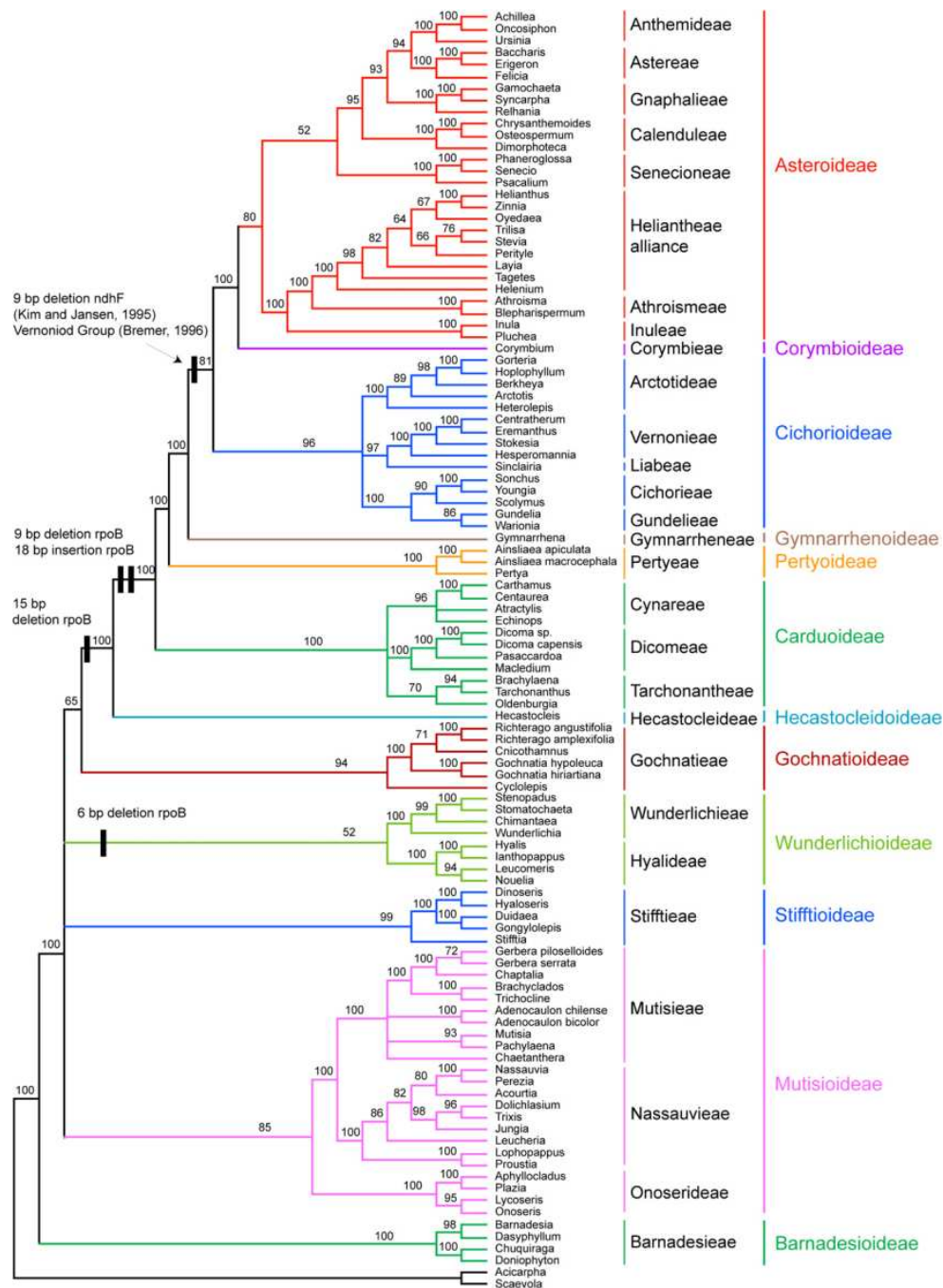


Figura 03 - Sistema de Classificação de Funk *et al.* (2009) para subfamílias e tribos de Asteraceae.

Citogenética: técnicas e aplicações

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo aos cromossomos, isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização e replicação, quanto à sua variação e evolução. Dentre os

parâmetros que podem ser obtidos a partir de estudos citogenéticos, o número cromossômico, é de longe, o mais amplamente utilizado. O número cromossômico comumente está acompanhando de parâmetros morfológicos associados, como a forma dos cromossomos (metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico), a qual é determinada em função da posição do centrômero no cromossomo; e do tamanho dos cromossomos (Guerra, 1988). A obtenção dessas informações cromossômicas pode ser feita pelo uso de técnica convencional, na qual o cromossomo é corado por inteiro de forma homogênea. A técnica de coração por Giemsa é uma das mais comumente utilizadas pelo fato de produzir bons resultados e permitir a montagem de lâminas permanentes (Guerra & Souza, 2002).

Dados provenientes da aplicação da técnica convencional têm sido úteis na Citotaxonomia, contribuindo para elucidar quanto à circunscrição de diversos grupos vegetais. Nesse sentido, o conhecimento do número cromossômico das espécies é de grande importância. Números cromossômicos similares podem indicar relações de parentescos próximos, enquanto que números cromossômicos distintos podem, em muitos casos, representar uma barreira reprodutiva (Judd *et al.*, 2009).

No estudo com 14 espécies nativas da China da tribo Orchideae (Orchidaceae) (Luo, 2003), o número cromossômico $2n=42$ foi o mais frequente, mas foram encontrados outros valores como $2n= 32, 38, 40, 63, \text{ e } 98$. Essa variação sugeriu que a mudança do número básico de $x=7$ para $x=8$ desempenhou um importante papel na evolução da tribo Orchideae. Marhold *et al.* (2010) analisaram a variação citogenética em quatro espécies de *Cardamine* (Brassicaceae), a partir da contagem cromossômica e da análise de citometria de fluxo. Por meio desse estudo, os autores puderam confirmar a poliploidia e observar uma grande diversidade de citótipos nas espécies estudadas de *Cardamine* na Ásia Oriental.

Grupos de plantas com números cromossômicos constantes podem ser diferenciados pelo cariótipo. Costa & Forni-Martins (2003) observaram em nove espécies de *Echinodorus* e *Sagittaria* (Alismaceae Vent.), que, embora o número cromossômico $2n=22$ se mantivesse conservado, havia uma diversidade na forma e no tamanho dos cromossomos. As espécies apresentaram de 18 a 20 cromossomos acrocêntricos, sendo os demais metacêntricos, exceto em *S. rhombifolia*, que também apresentou dois submetacêntricos. O comprimento total da cromatina (CTC), que corresponde ao somatório

do comprimento de todos os cromossomos da célula; variou de 81,1µm na espécie *E. grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli a 121,1µm em *E. longipetalus* Micheli.

Corêa & Forni-Martins (2004) estudaram 14 espécies do cerrado brasileiro da família Rubiaceae, distribuídas em duas subfamílias Ixoroideae e Rubioideae. Esse estudo revelou uma constância no número cromossômico de $2n=22$ e poliploidia ($2n=66$) para a espécie *Amaioua intermedia*. O trabalho com representantes da família Araliaceae (Yi *et al.*, 2004), evidenciou uma ampla variação no número cromossômico para a família, de $2n=24$ a 144. Os autores atribuíram essa ampla variação a eventos de poliploidia e, mais raramente, a eventos de aneuploidia.

No estudo (Viccini *et al.*, 2005) com espécies do gênero *Lippia* da família Verbenaceae foi determinado o número haploide (n) de 14 espécies. O valor de n predominante variou de 10 a 28, sendo que $n=12$ foi o mais frequente. Todas as espécies estudadas tiveram seu número cromossômico haploide determinado pela primeira vez.

Como técnicas de coloração adicionais às convencionais, temos as técnicas de diferenciação longitudinal dos cromossomos. Através dessas técnicas podemos observar marcas (bandas) nos cromossomos, bem como sítios (segmentos de DNA previamente identificados), os quais fornecem um maior nível de detalhamento dos cromossomos e consequentemente mais um padrão de diferenciação citogenética.

Dentre as técnicas de bandamento, temos a dupla coloração por CMA/DAPI, ou simplesmente bandamento CMA/DAPI, baseada na técnica de Schweizer (1976) e descrita com mais detalhes por Deumling & Greilhuber (1982). Nesta técnica são utilizados fluorocromos que marcam regiões heterocromáticas que apresentam uma grande proporção de bases adenina/timina (AT) e, citosina/guanina (GC). Desta forma, o fluorocromo cromomicina A_3 (CMA) cora preferencialmente regiões ricas em GC, enquanto que o fluorocromo 4-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) cora regiões ricas em AT. Com frequência, as “bandas positivas” (mais brilhantes que o resto do cromossomo) ocorrem na mesma posição das “bandas negativas” do fluorocromo complementar (Jacobs *et al.*, 2000).

O desenvolvimento da técnica de Hibridização *In Situ* (HIS) marcou a transição da citogenética clássica para citogenética molecular pelo fato de combinar o conhecimento de biologia molecular com a citogenética. Desse modo, a técnica se fundamenta no fenômeno natural da complementariedade de bases do DNA. A técnica de hibridização *in situ* (HIS)

mais amplamente aplicada em estudos citogenéticos é a técnica de FISH. Nesta técnica (Fluorecent *In Situ* Hybridization) faz-se uso de pequenas sequências de DNA, as quais, uma vez marcadas, funcionam como sondas nas células em estudo (Figura 04). As sondas mais frequentemente utilizadas na FISH são as correspondentes aos genes ribossomais, DNAr 45S e 5S (Figura 05), devido ao alto grau de conservação e tamanho desses sítios (sequência de DNA específica) que permite posterior visualização em microscópio de fluorescência (Guerra, 2004).

Na literatura podemos encontrar trabalhos que fazem uso de apenas uma técnica citogenética, e trabalhos que combinam duas ou mais técnicas. No trabalho de Vanzela & Guerra (2000), por exemplo, no estudo com cromossomos holocêntricos de seis espécies de *Rhynchospora* (Cyperaceae), os autores aplicaram as técnicas de coloração de Giemsa, bandamento C e Bandamento CMA₃/DAPI. Através da aplicação dessas técnicas e os padrões de bandas encontrados, os autores concluíram que, embora os cromossomos sejam holocêntricos, os padrões de bandas encontradas foram semelhantes aos encontrados em cromossomos monocêntricos de plantas.

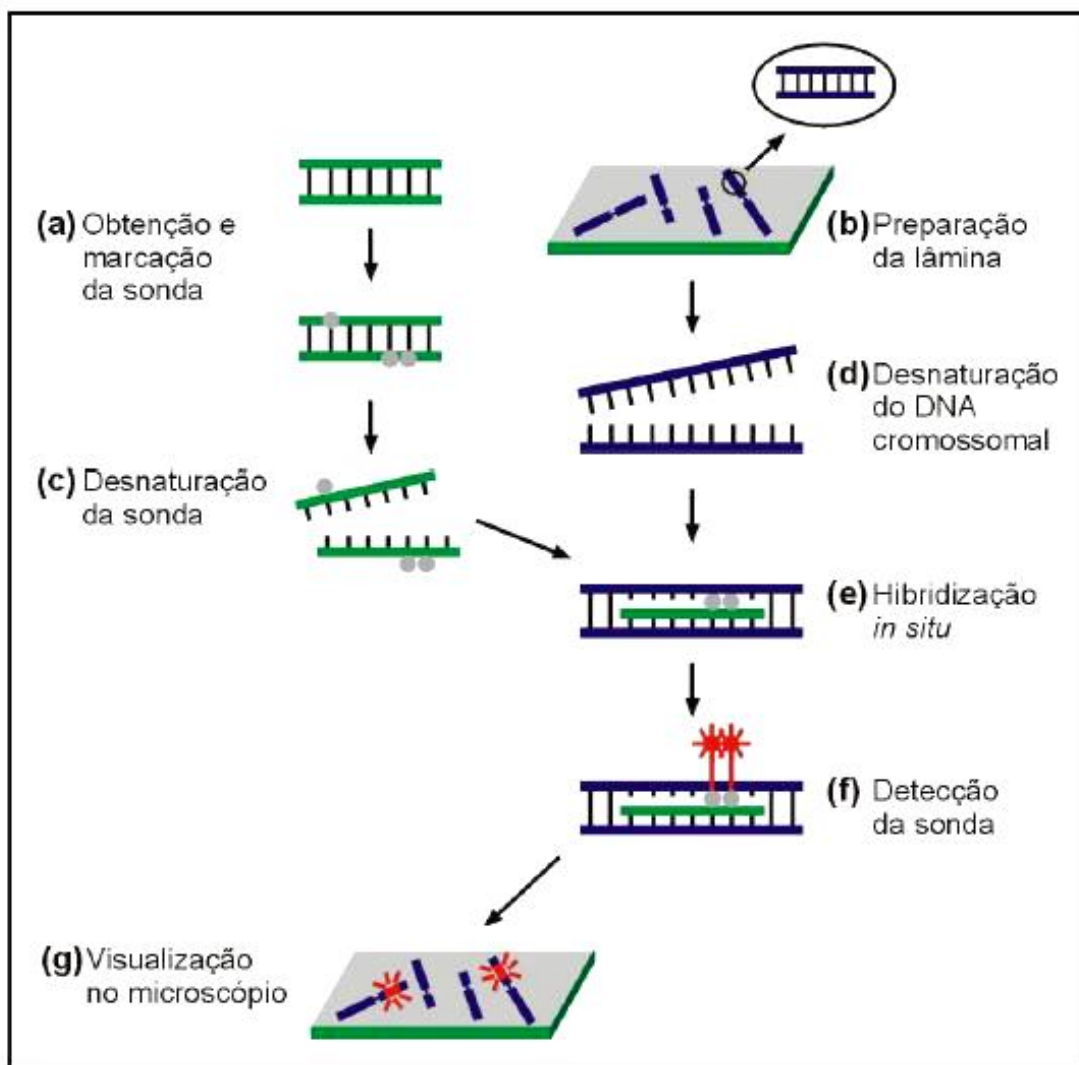


Figura 04 - Principais etapas da técnica de hibridização *in situ* (FISH). A marcação da sonda (a); é feita independente da preparação da lâmina (b). Em seguida, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados (c, d) e, quando colocados em contato, a sonda hibridiza *in situ* (e) com o DNA-alvo. A sonda marcada pode ser detectada por anticorpos ligados a fluorocromos (f) e visualizada diferencialmente ao microscópio (g). Reproduzido de Guerra (2004).

Abkenar *et al.* (2007) utilizaram a técnica de bandamento CMA para examinar a diferenciação dos parentais de um híbrido de *Citrus* trigenérico ($2n=18$), oriundo do cruzamento de *Fortunella sp.* x (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), e com isso identificar a possível contribuição cromossômica dos parentais para o híbrido. Fregonezi *et al.* (2006) estudaram os cariótipos de quatro espécies brasileiras de *Cestrum* (*C. amictum*, *C. intermedium*, *C. sendtnerianum* e *C. strigilatum*) aplicando a coloração convencional de Feulgen, C-Giemsa, bandamento CMA/DAPI e técnica de FISH. Os resultados sugeriram

que a diferenciação cariotípica era devida, principalmente, ao tamanho e posição de DNA repetitivo.

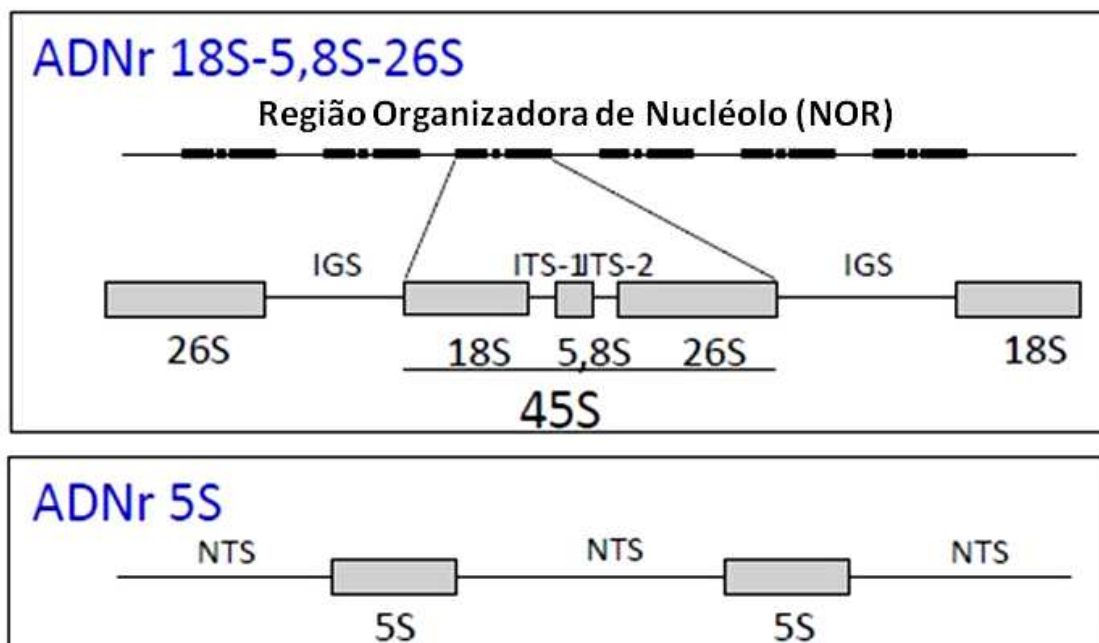


Figura 05– Representação da estrutura do DNAr 45S e 5S. Créditos: JD. Urdampilleta.

Estudos citogenéticos em Asteraceae

Segundo Semple & Watanabe (2009) cerca de 60% dos gêneros de Asteraceae tem pelo menos uma contagem, sendo relatada grande variação, que vai de $2n = 4$ (em *Brachyscome dichromosomatica* e *Xanthisma gracile*) a $2n = \text{ca. } 432$ (em *Olearia albida*), porém o número mais frequente é $2n = 18$. Contudo, considerando a riqueza da família (23.000 espécies), esse número ainda é pequeno, porque é sabido que há gêneros que possuem mais de mil espécies, como é o caso do gênero *Baccharis*.

O número cromossômico básico (x) da família vinha sendo apontado como $x = 9$, com base na análise morfológica, o que foi confirmado com a incorporação de dados moleculares. Contudo, a partir do mapeamento do número cromossômico sobre novos cladogramas construídos para as subfamílias de Asteraceae, foi possível determinar dois números básicos primários, um referente ao ancestral ($x=9$) e o outro derivado por dispoloidia, onde o valor de x pode variar de 2 até 11. Além destes, há números básicos secundários (x_2), originados por poliploidia (tanto por aloploidia e autopoliploidia, às

vezes seguida de disloidia), resultando na variação de $x_2 = 3$ até 19. Essa variação está presente em nível de tribos, subtribos e gêneros (Semple & Watanabe, 2009).

Apesar do número considerável de trabalhos referentes à contagem cromossômica e análise de cariótipos de espécies de Asteraceae, este número ainda é muito pequeno quando comparado com a riqueza de espécies da família. No que diz respeito aos estudos cromossômicos utilizando técnicas moleculares, os trabalhos são mais escassos. Como trabalhos que fizeram uso de técnica convencional e que contribuíram para citotaxonomia de Asteraceae, podemos citar o trabalho de Ruas & Aguiar-Perecin (1997) que analisaram o cariótipo de dez espécies do gênero de *Mikania* por meio da técnica de coloração de Feulgen. Todas as espécies estudadas apresentaram um grande par de cromossomos com uma constrição secundária na região do braço longo. A morfologia desse cromossomo levou as autoras a sugerir que pode se tratar de uma marca citológica para o gênero.

Mansanares *et al.* (2002) estudaram 18 espécies de *Lychnophora* pertencentes a três secções: *Lychnocephaliopsis*, *Lychnophora* e *Lychnophoriopsis*. Três números básicos foram encontrados, $x=17$, 18 e 19 em diferentes espécies. Como esses números diferentes foram encontrados nas três secções, os autores concluíram que o número cromossômico não é um caráter distintivo em nível infragenérico, mas que por outro lado, é um dado importante para distinguir algumas espécies cujos limites às vezes são questionados.

Oliveira *et al.* (2004) examinaram o número cromossômico e algumas características morfológicas de distintas populações de *Stevia rebaudiana*. Para a análise citogenética foram avaliadas células em mitose e meiose, e normalidade das tétrades. Além disso, os estômatos e grãos de pólen foram medidos e algumas características de plantas foram estudadas morfometricamente. Todas as populações apresentaram $2n=22$ ($x=11$), com exceção de duas, que apresentaram $2n=33$ ($3x$) e $2n=44$ ($4x$). As plantas triploides e tetraploides foram as que apresentaram menor taxa de normalidade, ou seja, de tétrades perfeitas. Os autores observaram que quanto maior o nível de ploidia, maior o tamanho do pólen e dos estômatos e menor o seu número por unidade de área.

Fregonezi *et al.* (2004) estudaram três espécies de Asteraceae, *Crepis japonica*, *Galinsoga parviflora* e *Chaptalia nuntas*, utilizando a coloração convencional de Feulgen, bandamento C-CMA₃ e técnica de FISH com a sonda de DNAr 45S. As três espécies apresentaram diferenças quanto ao número e forma dos cromossomos. Entretanto, em

relação à localização dos sítios de DNAr 45S, sempre apareceram nos braços curtos dos cromossomos, e associados às regiões heterocromáticas ricas em G-C.

Moraes & Guerra (2010) estudaram a diferenciação citológica entre os dois subgenomas do tetraploide *Emilia fosbergii* Nicolson ($2n=20$) e sua relação com *E. sonchifolia* (L.) DC. ($2n=10$), por meio da técnica da dupla coloração CMA/DAPI, técnica de hibridização GISH (hibridização de todo o genoma) e FISH para os sítios de 45S e 5S de DNAr). Tal estudo teve como objetivo testar a hipótese da participação de *E. sonchifolia* na formação de *E. fosbergii*. Como resultado, os autores observaram que os dez cromossomos menores de *E. fosbergii* estão fortemente relacionados com os dez cromossomos de *E. sonchifolia*.

No trabalho de Oliveira *et al.* (2012) foram estudadas três espécies de *Vernonia* Schreb da subsecção *Macrocephalae* (*V. bardanoides*, *V. linearifolia* e *V. tomentella*), para complementar o conhecimento sobre os cariótipos do gênero. Foram utilizadas diferentes técnicas: AgNOR, triplacoloração de CMA/DA/DAPI (CDD) e FISH para a sonda de 45S. Todas as espécies apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n=32$) e duas bandas CMA terminais e duas bandas NOR (Regiões Organizadoras de Nucléolo). A FISH indicou número diferente de sítios de DNAr 45S, todos terminais, sendo dois em *V. linearifolia* e *V. tomentella*, e seis em *V. bardanoides*.

Serra do Japi-SP

A Serra do Japi (Figura 06) é uma importante feição geomorfológica situada a oeste do Planalto Atlântico nas proximidades de Jundiaí e Cabreúva, no estado de São Paulo, nas coordenadas 23°11'S e 46°52'W. Dentre os padrões de paisagens regionais identificados nos setores planálticos de domínios dos “mares de morros” florestados em terras do Brasil Sudoeste, a Serra do Japi apresenta-se como um conjunto de serrinhas de porte mais avantajado, dotados de bordas íngremes e cimeiras aplainadas (Ab'Saber, 1992). O seu território abriga uma das últimas grandes áreas de floresta contínua do Estado de São Paulo abrangendo uma área de 354 km² (Vasconcellos-Neto *et al.*, 2012). A Serra do Japi apresenta diversas formações vegetais, como Floresta Mesófila Secundária, Floresta Mesófila de Altitude e os Lajedos Rochosos, todas pertencentes ao domínio da Mata Atlântica. Em virtude de sua posição geográfica, paisagens, riquezas de espécies e banco

genético, em 1991, a Prefeitura Municipal de Jundiá criou a Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi através da Lei 3.672/91 (Figura 07), sendo regulamentada em 1992 pela Lei municipal 13.196/92. Dois anos depois a Serra do Japi foi reconhecida pela UNESCO como integrante da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (UNESCO, 1994), tornando-se uma unidade de conservação com importância mundial.

No que se refere ao clima, a maior precipitação pluviométrica na Serra do Japi ocorre nos meses de dezembro e janeiro. A temperatura média anual varia em função da altitude, sendo de 15,7°C na parte elevada e 19,2°C na parte baixa. O mês mais frio é julho (11,8°C a 15,3°C) e o mês mais quente é janeiro (18,4°C a 22,2°C) (Pinto, 1992).

A Serra do Japi se destaca por apresentar uma grande diversidade de espécies de Asteraceae (Figura 08). Dentre as 661 espécies encontradas no levantamento florístico feito por Lombardi *et al.* (2012) na RBM da Serra do Japi, Asteraceae (com 56 espécies) foi a família que apresentou maior riqueza de espécies, seguida de Fabaceae (37 espécies), Rutaceae (29 espécies), Poaceae (25 espécies), Solanaceae (24 espécies) e Cyperaceae (19 espécies). Em outro estudo florístico na Serra do Japi, especificamente com Asteraceae, feito por Monge & Semir (2012), o número de espécies subiu para 90 espécies, distribuídas em 11 tribos e 55 gêneros. Esse número é considerado alto, quando comparado com outras áreas amostradas no Brasil, tanto em formações abertas, como em formações fechadas (Tabela 01).

Deve-se salientar ainda que a família Asteraceae para Serra do Japi não é importante apenas como componente da vegetação, mas pela quantidade de espécies encontradas, alta frequência destas na vegetação e por suas funções ecológicas desempenhadas (Monge & Semir, 2012).

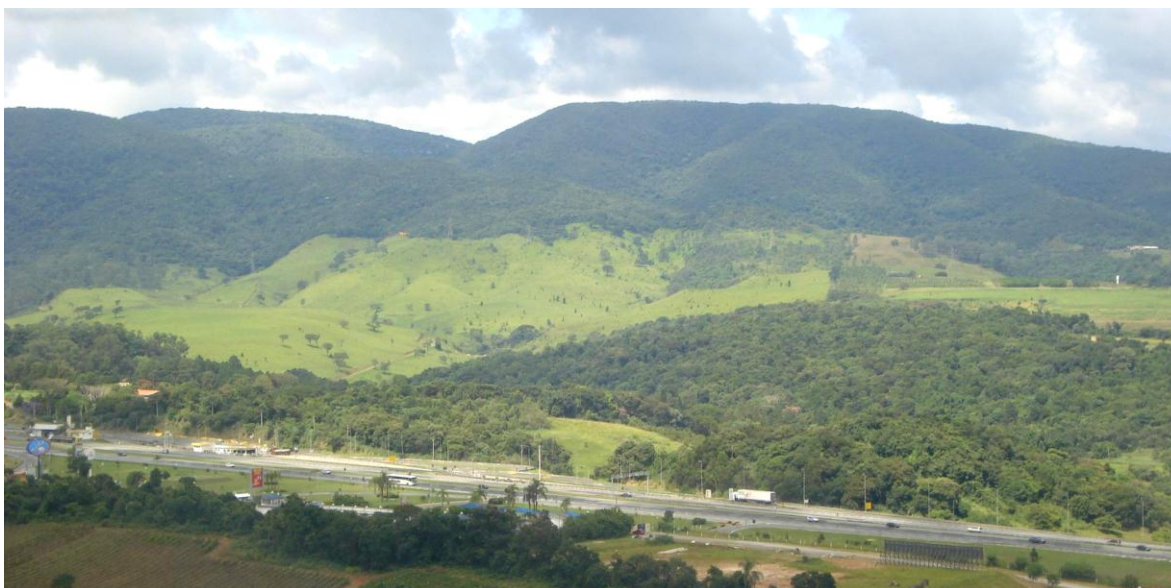


Figura 06 - Visão geral da Serra do Japi, município de Jundiaí-SP (foto - Ronaldo Pereira).

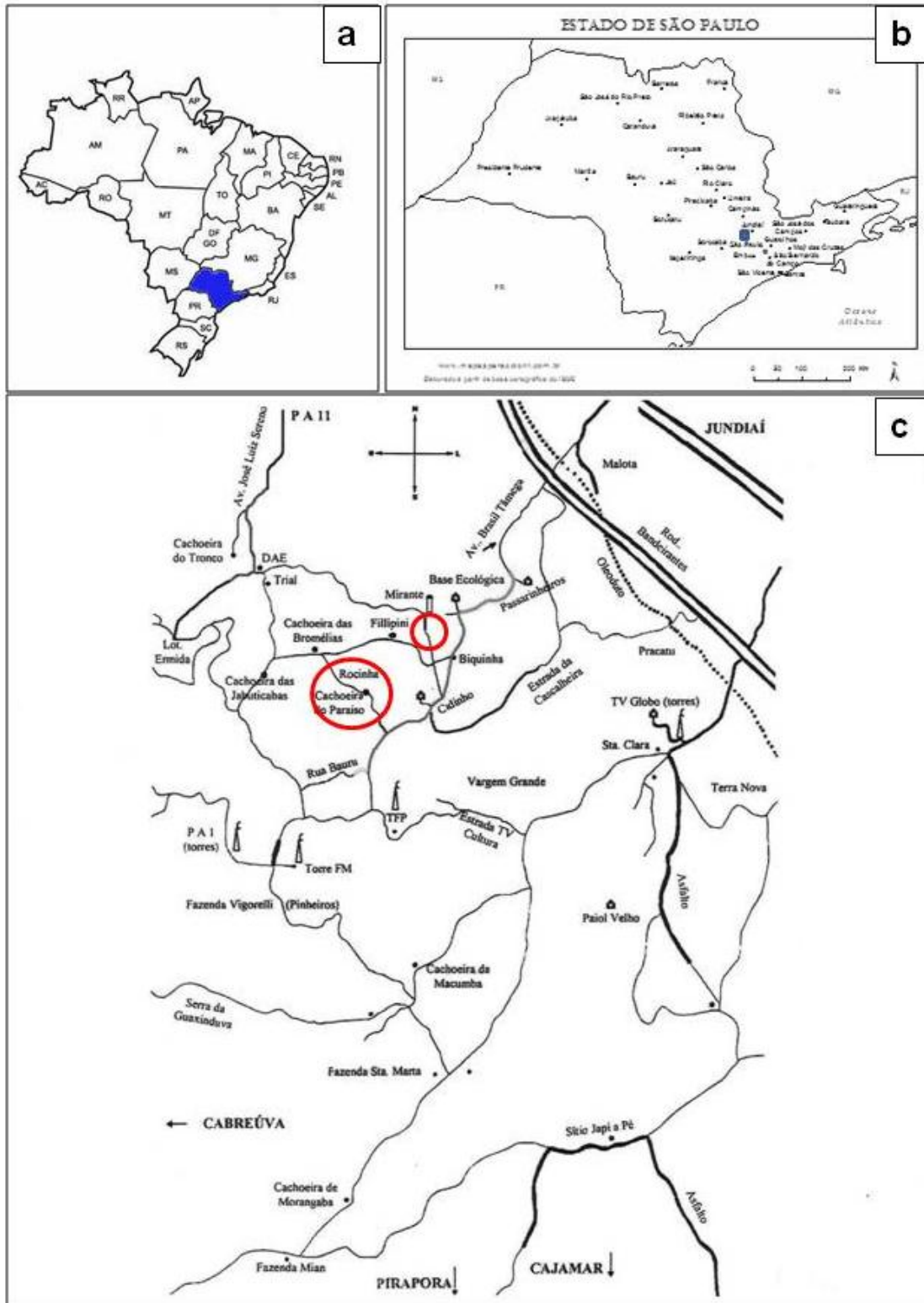


Figura 07- Mapa da Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi: a) Brasil, b) Estado de São Paulo, c) trilhas da Serra do Japi (detalhe em vermelho) (Paro *et al.*, 2012). Adaptado.

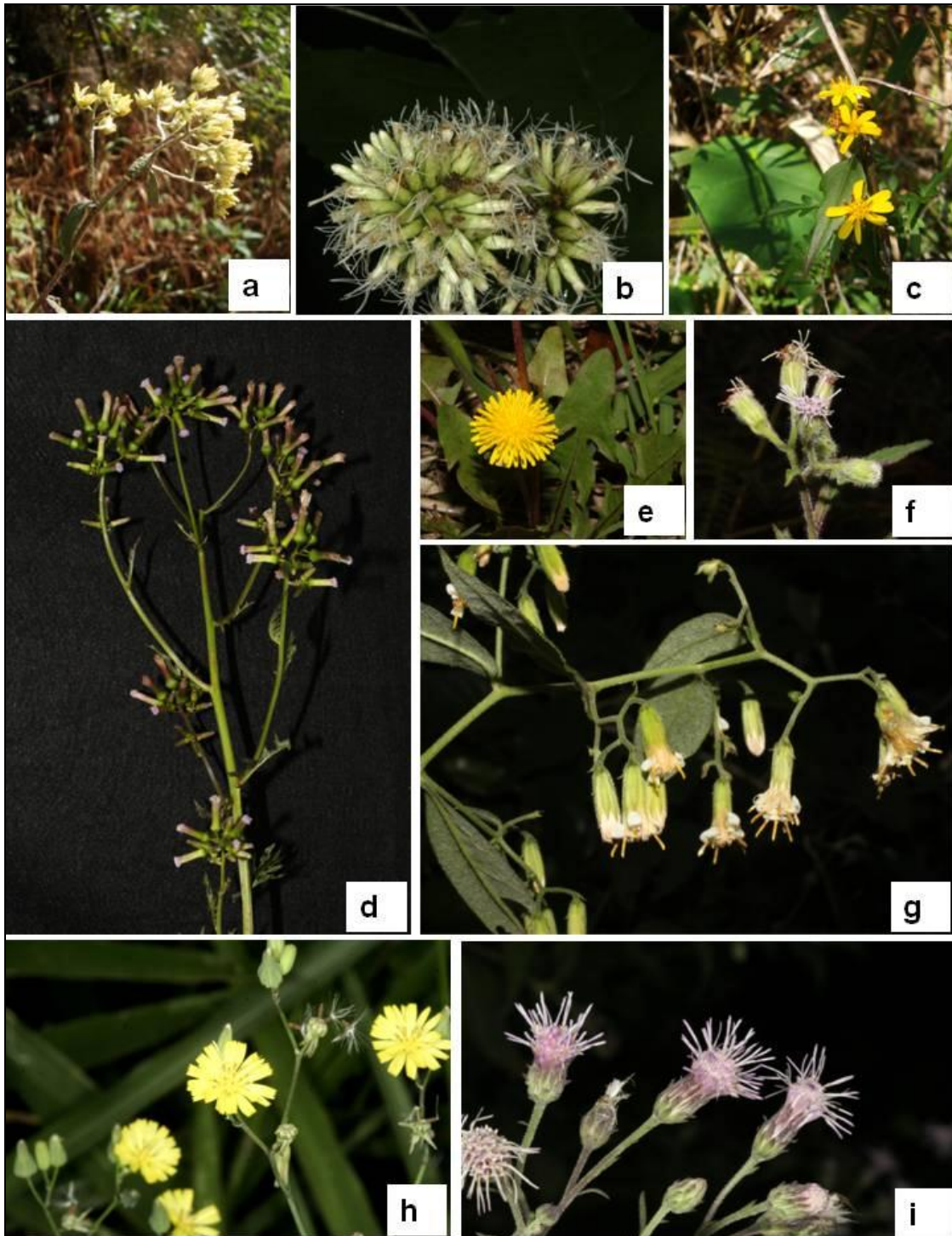


Figura 08- Alguns representantes de Asteraceae amostradas na Serra do Japi-SP: **a-** *Achyrocline saturioides* (Lam.) DC., **b-** *Critonia megaphyla* (Baker) R.M. King & H. Rob., **c-** *Calea pinatifida* (R. Br.) Less., **d-** *Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC., **e-** *Taraxacum officinale* F.H. Wigg, **f-** *Trichogoniopsis adenata* (DC.) R.M. King & H. Rob., **g-** *Trixis antmenhorea* (Schrunk) Kuntze (Fotos: Marcelo Monge), **h-** *Yougia japonisa* (Lam.) DC., **i-** *Heterocondilus alatus* (Vell.) R.M. King & H. Rob. (Fotos: João Vasconcelos).

Tabela 01: Comparação de levantamentos florísticos com Asteraceae de diversas localidades do Brasil, com suas respectivas fisionomias vegetais (Monge & Semir, 2012). Adaptado.

Tabela 2. Levantamentos florísticos com representantes da família Asteraceae por localidade, nº de espécies, fisionomias vegetacionais (AR = Afloramentos Rochosos; C = Cerrado; CA = Campo de Altitude; CR = Campo Rupestre; CpU – Campo Úmido; FA = Floresta Alto-montana; FE = Floresta Estacional; FO = Floresta Ombrófila), formação vegetacional aberta ou fechada (A ou F) e autor.

Localidade	Nº de spp.	Fisionomias	Formação	Autor
Chapada dos veadeiros, GO	125	C e FE	A	Munhoz & Proença 1998
Serra do Lopo, MG	102	FA, CA e AR	F	Yamamoto 2009
Fontes do Ipiranga, SP	122	FO	F	Nakajima <i>et al.</i> 2001
Galheiro, MG	107	C	A	Hattorii & Nakajima 2008
Ilha do Cardoso, SP	59	FO	F	Souza-Buturi <i>et al.</i> 2008
Itacolomi, MG	219	CR	A	Almeida 2008
Itapuã, RS	162	-	-	Beretta <i>et al.</i> 2008
Litoral Norte, RS	70	FO, Re e CpU	F	Azevedo-Golçalves <i>et al.</i> 2004
Monte Verde, MG	65	FA, CA e AR	F	Meireles 2003
Pedregulho, SP	65	C, CR e FE	F	Sasaki & Mello-Silva 2007
Picinguaba, SP	74	FO	F	Moraes & Monteiro 2006
Serra da Canastra, MG	215	C, CR e FE	A	Nakajima 2001
Serra do Cipó, MG.	169	C, CR	A	Leitão-Filho & Semir 1987
Serra do Japi, SP.	90	FE	F	Monge & Semir 2010 (este trabalho)
Serra Fina, MG	94	FA, CA e AR	A	Meireles 2009

OBJETIVOS

Este trabalho objetivou:

- Caracterizar o cariótipo de diversas espécies nativas da família Asteraceae ocorrentes na Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi, pela determinação do número cromossômico e detalhamento de caracteres de tamanho e morfologia dos cromossomos por meio de técnicas de coloração convencional, de bandamentos cromossômicos e de hibridização de DNA *in situ*- FISH;
- Utilizar os dados cariotípicos como caracteres adicionais para a análise taxonômica das tribos de Astereceae que apresentaram mais abundância de espécies.
- Ampliar o conhecimento da flora brasileira, com ênfase na Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra.

ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Esta tese está organizada em dois capítulos. O primeiro capítulo analisou a contribuição do número e da morfologia cromossômica como características taxonômicas em espécies de Asteraceae que ocorrem na Serra do Japi-SP. O segundo capítulo investigou os padrões cariotípicos de alguns representantes da família Asteraceae, a partir das técnicas de bandamento cromossômico CMA/DAPI e FISH.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A. N. 1992. **Serra do Japi, sua origem geomorfológica e a teoria dos refúgios**. In: MORELLATO, L. P. C. (org.) História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas-SP. Editora da Unicamp/FAPESP.
- Abkenar, A. A.; Matsumoto, R.; Tanaka, S; Katayama, Y. 2007. Parental chromosome differentiation in citrangequat (*Fortunella sp.* x (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)) using CMA banding patterns. **Scientia Horticulturae** **114**: 74-76.
- Bremer, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland, Oregon: TIMBER PRESS.
- Bremer, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. In: Hind, D. J. N., Beentje, H. J. (Eds) **Compositae: Systematics. Proceedings of the Internacional Compositae Conference**. Vol. 1. Richmond, Kew Royal Botanic Gardens.
- Cassini, H. 1817. Aperçu des genres nouveaux fougues par M. Henri Cassini dans la famille des Synanthérées. Paris. **Bull. Sci. Soc. Phill.** **4**: 66-68.
- Corrêa, A. M. & Forni-Martins, E. R. 2004. Chromosomal studies of species of Rubiaceae (A. L. de Jussieu) from the Brazilian cerrado. **Caryologia** **57**. (3): 250-258.
- Costa, J, Y & Foni-Martins, E. R. 2003. Karyology of some Brazilian species of Alismataceae Vent. **Botanical Journal of the Linnean Society** **142**: - .
- De Candolle, A. P. 1836. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis**, vol 5. Paris, Treuttel & Würtz.

- Deumling, B. & Greilhuber, J. 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding, **Chromosoma** **84**:535-555.
- Fregonezi, J. N. *et al.* 2006. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology**, **29**, 1, 97-104.
- Fregonezi, J. N.; Torezan, J. M. D.; Vanzela, A. L. L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. **Genetics and Molecular Biology**, **27**, 2, xxx-xxx.
- Funk, V. A.; Susanna, A.; Stuessy, T. F.; Robinson, H. 2009. **Classification of Compositae**. In: Funk, V. A.; Susanna, A.; Stuessy, T. F.; Bayer, R. J. eds. Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, 171-189.
- Guerra, M. & Souza, M. J. 2002. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto-SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.
- Guerra, M. 1988. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara.
- Guerra, M. 2004. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 184p.
- Hofman, O. 1890. Compositae. In **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**. Vol 4. In: Engler & K. Prantl. Eds. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann. pp 87-391.

- Jacobs, M. D; Gardner, R. C. & Murray, B. G. 2000. Cytological characterization of herechromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. **Plant Systematic Evolution** **223**: 71-79.
- Jeffrey, C. J. 1978. Compositae. In: Heywood, V. H. (Ed.). **Flowering Plants of the World**. New York. May- flower Books.
- Judd, W. S. *et al.* 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmede, 3ed., 632p.
- King, R. M.; Janaske, P. C. & Lellinger, D. B. 1995 a. Cassini on Compositae II. **Monographs in Systmatic Botany from Missouri Botanical Gardens** **54**.
- King, R. M.; Janaske, P. C. & Lellinger, D. B. 1995 b. Cassini on Compositae III. **Monographs in Systmatic Botany from Missouri Botanical Gardens** **54**.
- Leitão-Filho, H. de F. 1992. **A flora arbórea da Serra do Japi**. In: Morellato, L. P. C. (org.) *História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil*. Campinas-SP. Editora da Unicamp/FAPESP.
- Lissing, C. F. 1832. **Synopsis Generum Copositarum**. Berlin: Duncker & Humboldt.
- Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 25 Jul. 2014.
- Lombardi, J. A *et al.* 2012. Vascular flora of Serra do Japi Biological Reserve, Jundiá, southeastern Brasil. **Rodriguésia** **63** (2): 333-340.
- Luo, Y. 2004. Cytological studies on some representative species of the tribe Orchideae (Orchidaceae) from China). **Botanical Journal of the Linnean Society** **145**: 231-238.

- Mansanares, M. E.; Forni-Martins, E. R.; Semir, J. 2002. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae, Vernonieae, Asteraceae). **Caryologia** Vol. **55**, 4: 367-374.
- Marhold, K. *et al.* 2010. Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid Cardamine (Brassicaceae) species. **Annals of Botany** **105**:249-264.
- Marzinek, J. De-Paula, O. C.; Oliveira, D. M. T. 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. **Revista Brasil. Bot.**, V.**31**, n.3, p.549-553, jul.-set.
- Monge, M. & Semir, J. 2012. **A família Asteraceae na Serra do Japi**. In: Vasconcellos-Neto, J. *et al.* (Organizadores). Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade. Curitiba – PR, CRV, 1ed., 628p.
- Moraes, A. P. & Guerra, M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). **Plant Syst Evol** **287**:113-118.
- Oliveira, V. M.; Semir, J.; Forni-Martins, E. R. 2012. Banding and FISH in three species of, subsection *Macrocephalae* (Asteraceae, Vernonieae). **Plant Syst Evol** DOI **10.1007/s00606-012-0606-8**.
- Oliveira, V. M.; Forni-Martins, E. R.; Magalhães, P. M.; Alves, M. N. 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, **27**, 2, 215-222.
- Panero, J. L. & Funk, V. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington** **115**(4): 909-922.

- Panero, J. L. & Funk, V. 2008. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **47** (2008) 757–782.
- Paro, C. M.; Romero, G. Q.; Martins, U.; Vasconcellos-Neto, J. 2012. **Os besouros serra-pau (Onciderini, Cerambycidae) da Serra do Japi, Jundiaí-SP.** In: Vasconcellos-Neto, J. *et al.* (Organizadores). Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade. Curitiba – PR, CRV, 1ed., 628p.
- Pinto, H. S. 1992. **Clima da Serra do Japi.** In: MORELLATO, L. P. C. (org.) História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas-SP. Editora da Unicamp/FAPESP.
- Pinto, R. B. 2013. **Estudos citogenéticos e taxonômicos em espécies brasileiras de *Swartzia* Schreb. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE).** Tese de mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Ruas, C. F. & Aguiar-Perecin, M. L. R. 1997. Chromosome evolution in the genus *Mikania* (Compositae). **American Journal of Botany** **84**(9): 1156-1163.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromocytin and dapi. **Chromosoma** **58**: 307-324.
- Semple, J. C. & Watanabe, K. 2009. **A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosomal base number evolution.** In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. FUNK, V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.
- Simpson, B. B. 2009. **Economic importance of Compositae.** In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. FUNK, V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.

- Soltis, D. E. *et al.* 2011. Angiosperm phylogeny : 17 genes, 640 taxa. **American J. Bot** **98** 704-730.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2005. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa,SP: Instituto Plantarum.
- UNESCO. 1994. **Réserve de la Biosphère de la Ceinture verte de la ville de São Paulo comme partie intégrante de la Réserve de la Biosphère de la Forêt Atlantique.** MAB – Programme sur l' Homme et al Biosphère.
- Vanzela, A. L. L. & Guerra, M. 2000. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, **23**, 2, 453-456.
- Vasconcellos-Neto, J. *et al.* (Organizadores). 2012. **Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade.** Curitiba – PR, CRV, 1ed., 628p.
- Viccini, L. F.; Pierre P. M. O.; Praça, M. M.; Souza da Costa, D. C.; Costa Romanel, E. da; Sousa, S. M. de; Pereira Peixoto, P. H.; Gonçalves Salimena, F. R. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Pl. Syst. Evol.** DOI **10.1007/s00606-005-0351-3**.
- Yi1, T.; Porter P. Lowry II, Gregory M. Plunkett & Jun Wen. 2004. Chromosomal evolution in Araliaceae and close relatives. **Taxon** **53** (4): 987–1005.

CAPÍTULO 1

“Características cariotípicas em espécies de Asteraceae da Serra do Japi-SP”.

RESUMO

A família Asteraceae é composta por 1.600 gêneros e 23.000 espécies, sendo bem representada no Brasil. Estudos cromossômicos em Asterecae evidenciaram grande variação de números cromossômicos ($2n=4$ a $2n=$ ca. 432), morfologia cromossômica variada, com predomínio de cromossomos metacêntricos e pequenos (2 a $7\mu\text{m}$). A família é rica em espécies, porém ainda é bem reduzido o número de trabalhos citogenéticos, que abordam principalmente a contagem cromossômica. Desse modo, o estudo objetivou caracterizar o cariótipo de espécies nativas da família Asteraceae ocorrentes na Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi, que se destaca por apresentar uma grande diversidade de espécies de Asteraceae. Foi determinado o número cromossômico e detalhados o tamanho e a morfologia dos cromossomos, utilizando a técnica convencional de Giemsa. Para caracterização do cariótipo também foram calculados parâmetros comprimento total da cromatina (CTC), relação entre braços ($r=l/c$) e o índice de simetria (TF%). Das 45 espécies de Asteraceae amostradas na Serra do Japi nesse estudo, foi possível determinar o número cromossômico de 35 espécies, distribuídas em 14 tribos e 26 gêneros. Foi observada grande diferença quanto ao número cromossômico, de $2n=16$ em *Youngia japonica* a $2n=72$ em *Bidens pilosa* e *B. subalternans*. O tamanho cromossômico variou de $0,62\mu\text{m}$ em *Heterocondylus vitalbae* a $3,5\mu\text{m}$ em *Chaptalia nutans*. Seis novas contagens foram determinadas e quatro divergiram de contagens anteriores: *B. subalternans* ($2n=72$), *Chromolaena odorata* ($2n=30$), *Praxelis kleineoides* ($2n=30$), *Vernonia diffusa* ($2n=34$). O índice de simetria TF% variou de 29 em *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) a 44 em *G. intermedia* ($2n=20$). Dessa forma, os cariótipos das espécies estudadas podem ser considerados moderadamente simétricos. Foi detectada a presença de citótipos em espécies pertencentes às tribos Eupatorieae e Coreopsidaeae. A ampla variação de números cromossômicos encontrada ($2n=18$ a 72) confirma a alta variabilidade cromossômica na família Asteraceae. O número cromossômico básico (x) das tribos estudadas variou de $x=8$ a $x=17$, sendo $x=10$ o mais frequente (Asteraceae, Eupatorieae, Inuleae, Senecioneae e Vernonieae). Em *Vernonia*, o gênero mais bem representado, o valor de x mais frequente foi $x=17$ e em *Baccharis*, o segundo gênero mais representado, $x=9$. A ampla variação

cromossômica em Asteraceae, comprovada nesse estudo, não pode ser explicada apenas por um único evento, mas por uma combinação de poliploidia, disploidia e aneuploidia, como já indicado para as tribos Vernonieae e Cichorieae em estudos anteriores.

Palavras chaves: Asteraceae, Serra do Japi, Giemsa, número cromossômico, cariótipo, citótipo.

ABSTRACT

Asteraceae family comprises 1.600 genera and 23.000 species and is well represented in Brazil. Chromosomal studies in Asteraceae show a large variation in the chromosome numbers ($2n=4$ a $2n=$ ca. 432), variable chromosome morphology, mainly with metacentric and small chromosomes (2 to $7\mu\text{m}$). The family is species rich, but the number of cytogenetics works is still reduced, mainly with chromosome counts. Thereby, this study aimed to characterize the karyotype of native species of Asteraceae family occurring in the Municipal Biological Reserve (MBR) of Japi mountain range, that stand out for presenting a large diversity of Asteraceae species. We determined the chromosomal number and detailed the size and morphology of chromosomes, using the Giemsa' conventional technique. To characterize the karyotype, we also calculated the parameters total length of chromatin (TLC); relation among chromosome arms ($r=l/c$) and the symmetry index (TF%). Of the 45 species of Asteraceae in Serra do Japi sampled in this study, but we could determine the chromosomal number of 35 species, distributed in 14 tribes and 26 genera. We observed large difference regarding chromosomal number, from $2n=16$ in *Youngia japonica* to $2n=72$ in *Bidens pilosa* and *B. subalternans*. The chromosomal size diversified from $0,62\mu\text{m}$ in *Heterocondylus vitalbae* to $3,5\mu\text{m}$ in *Chaptalia nutans*. Six new counts were determined and four differed of previous counts: *B. subalternans* ($2n=72$), *Chromolaena odorata* ($2n=30$), *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) and *Vernonia diffusa* ($2n=34$). The symmetry index TF% varied from 29 in *Praxelis kleineoides* ($2n=30$) to 44 in *G. intermedia* ($2n=20$). Thus, the karyotype of the studied species can be considered moderately symmetric. It was detected the presence of cytotypes in species belonging to tribes Eupatorieae and Coreopsideae. The large chromosomal number variation found ($2n=18$ a 72) confirms the high chromosomal variability in the Asteraceae family. The basic number (x) of studied tribes varied from $x=8$ to $x=17$, being $x=10$ the most frequent (Asteraceae, Eupatorieae, Inuleae, Senecioneae and Vernonieae). In *Vernonia*, the most well-represented genus, the most frequent basic chromosome number was $x=17$ and in *Baccharis*, the second most well-represented genus, $x=9$. The extensive chromosomal variation in Asteraceae corroborated in this study could not be explained

only for a single event, but for a combination of polyploidy, disploidy and aneuploidy, as already indicated to the tribes Vernonieae and Cichorieae in previous studies.

Key-words: Asteraceae, Japi mountain range, Giemsa, chromosome number, karyotype, cytotype.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae (Compositae), com aproximadamente 1.600 gêneros e 23.000 espécies, é a mais numerosa dentre as eudicotiledôneas, representando 10% da flora mundial. A família reúne plantas herbáceas, subarbustos, pequenas árvores e lianas. As suas flores podem ser bissexuais, unissexuais ou ainda estéreis; a inflorescência é do tipo capítulo e as sépalas são modificadas numa estrutura conhecida como papus. Seu fruto é do tipo cipsela, oriundo de um ovário ínfero e uni-ovular (Judd *et al.* 2009).

Segundo Simpson (2009), várias espécies de Asteraceae são importantes economicamente como plantas ornamentais, bebidas como chá, alimento, corante, produtora de adoçante, medicinais, especiarias e matéria prima para produção de borracha. A família é cosmopolita, com representantes ocorrendo no mundo todo, com exceção da Antártida. No Brasil, a família é bem representada, ocorrendo principalmente em formações abertas, como cerrados e campos (Souza & Lorenzi, 2005).

O primeiro a propor um sistema de classificação para Asteraceae foi Cassini (King *et al.*, 1995 a,b). Em seu sistema, a família foi dividida em 20 tribos. Posteriormente vários autores propuseram novos sistemas de classificação, alterando a organização interna da família. Bremer (1994), com base em caracteres morfológicos, subdividiu a família em três subfamílias e 17 tribos. Em 1996, Bremer reconheceu quatro subfamílias: Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae. Atualmente, com base em estudos filogenéticos que incorporaram marcadores plastidiais na análise, a família está dividida em 12 subfamílias e 43 tribos (Funk *et al.*, 2009).

Trabalhos de contagem cromossômica para Asterecae evidenciaram grande variação na família, de $2n=4$ em *Brachyscome dichromosomatica* e *Xanthisma gracile* a $2n=$ ca. 432 para *Olearia albida*. Contudo, como o número cromossômico mais frequente é $2n=18$, o número básico apontado para família é $x=9$. Além desse número básico, outros foram propostos, originados por processos de dispoloidia e poliploidia (Semple & Watanabe, 2009).

Na família a morfologia cromossômica é variada: cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Chatterjee & Stiarna, 1969; Guerra & Nogueira, 1990; Zhang & Xue-li He, 2010). Em *Lychnophora* (Mansanares, 2004) *sensu lato* e *Vernonia* (Oliveira *et al.*, 2007a; Oliveira *et al.*, 2007b; Oliveira *et al.*, 2012a; Oliveira *et al.*, 2012b)

a forma metacêntrica é a mais frequente. Em relação ao tamanho dos cromossomos, diversos autores (Watanabe, *et al.* 1995; Ruas & Aguiar-Perecin, 1997; Huziwara, 1957) têm encontrado valores pequenos (2-7 μ m) para a família.

Levando em consideração a riqueza de espécies da família, ainda é bem reduzido o número de trabalhos citogenéticos, mesmo apenas com contagem cromossômica. Assim, há a necessidade de mais trabalhos nesse campo de conhecimento para subsidiar a taxonomia de grupos infrafamiliares.

A Serra do Japi se destaca por apresentar uma grande diversidade de espécies de Asteraceae (Lombardi *et al.*, 2012; Monge & Semir, 2012). No último levantamento florístico, feito especificamente com Asteraceae, foram registradas 90 espécies, as quais foram distribuídas em 11 tribos e 55 gêneros. Deve-se salientar ainda que a família Asteraceae para Serra do Japi não é importante apenas como componente da vegetação, mas pela quantidade de espécies e alta frequência destas na vegetação, desempenhando importantes funções ecológicas (Monge & Semir, 2012).

Diante da riqueza de espécies e da diversidade cariotípica da família Asteraceae, e da carência de dados citogenéticos para subsidiar a reavaliação das delimitações de seus grupos taxonômicos, este trabalhou objetivou caracterizar o cariótipo de diversas espécies nativas da família Asteraceae ocorrentes Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi, pela determinação do número cromossômico e pelo detalhamento de caracteres de tamanho e morfologia dos cromossomos por meio de técnicas de coloração convencional. Também objetivou ampliar o conhecimento da flora brasileira, com ênfase na RBM da Serra do Japi, onde estudos citogenéticos são inexistentes para representantes da família Asteraceae.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A Serra do Japi (23°11'S; 46°52'W) é uma das últimas grandes áreas de floresta contínua do Estado de São Paulo, abrangendo 354 km² (Vasconcellos-Neto *et al.*, 2012). Dentre os padrões de paisagens regionais identificados nos setores planálticos de domínios dos “mares de morros” florestados em terras do Brasil Sudoeste, a Serra do Japi apresenta-se como um conjunto de serrinhas de porte mais avantajado, dotados de bordas íngremes e cimeiras aplainadas (Ab'Saber, 1992). Na área da Serra do Japi, a maior precipitação

pluviométrica ocorre nos meses de dezembro e janeiro. O mês mais frio é julho (11,8°C a 15,3°C) e o mês mais quente é janeiro (18,4°C a 22,2°C) (Pinto, 1992).

Espécies estudadas

Foram coletados frutos (cipselas) maduros de representantes de espécies de Asteraceae ocorrentes na Serra do Japi, na porção referente à Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi (Tabela 01). As coletas foram realizadas principalmente nas trilhas do Mirante e Paraíso I. Foram feitas um total de oito coletas à área de estudo num período de dois anos e meio. Para todas as espécies utilizadas nesse estudo foi coletado material testemunho para identificação e incorporação no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). A identificação botânica dos materiais foi feita pelo M.Sc. Marcelo Monge Egea e pelo Prof Dr. João Semir, especialistas na flora de Asteraceae da Serra do Japi.

Tabela 01: Relação das espécies de Asteraceae da Serra do Japi estudadas, distribuídas em suas respectivas tribos.

Espécies	Tribos/	Trilha/estrada	Número do Coletor
Astereae			
<i>Baccharis anomala</i> DC.		Trilha Paraíso I	Monge, M.1081
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.		Trilha Paraíso I	Monge, M. 765; Braga, K.R.R.
<i>Baccharis punctulata</i> A.P. DC.		Trilha Paraíso I	Monge, M. 785; Braga, K.R.R.
<i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho		Estrada para a Base	Braga, K.R.R. 14; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Symphyotrichum squamatum</i> (Spreng.) G.L. Nesom		Trilha Mirante	Monge, M. 749; Braga, K.R.R.
Cichorieae			
<i>Sonchus oleraceus</i> L.		Estrada sob a rodovia dos Bandeirantes	Monge, M. 730; Braga, K.R.R 67, 86.
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg		Estrada sob a rodovia dos Bandeirantes	Monge, M. 750; Braga, K.R.R.
<i>Youngia japonica</i> (Lam.) DC.		Estrada para a Base	Braga, K.R.R. 73
Coreopsideae			
<i>Bidens pilosa</i> L.		Trilha Mirante	Monge, M. 744, 783; Braga, K.R.R.
<i>Bidens subalternans</i> DC.		Estrada para a Base	Monge, M. 729; Braga, K.R.R 5.
Eupatorieae			
<i>Austroeupatorium</i> sp. R.M. King & H. Rob.		Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 63
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		Trilha Mirante	Monge, M. 1107
<i>Critonia megaphylla</i> (Baker) R.M. King & H. Rob.		Estrada para o DAE	Braga, K.R.R. 92

<i>Grazielia intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	Trilha Paraíso I	Monge, M. 778; Braga, K.R.R.
<i>Heterocondylus alatus</i> (Vell.) R.M. King & H. Rob.	Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 38; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Heterocondylus vitalbae</i> (DC.) R. M. King & H. Rob.	Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 33; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Mikania sp</i>	Trilha Mirante	Monge, M. 737; Braga, K.R.R.
<i>Praxelis kleineoides</i> (H.B.K.) R.M. King & H. Rob.	Trilha Mirante	Monge, M. 782; Braga, K.R.R.
<i>Trichogoniopsis adenantha</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	Estrada para a Base	Braga, K.R.R 58, 76.
Gnaphalieae		
<i>Achyrocline satuerioides</i> (Lam.) DC.	Estrada para a Base	Braga, K.R.R. 30; Monge, M.; Shimizu, G.
Gochnatieae		
<i>Gochnatia barrosii</i> Cabrera	Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 91
Helenieae		
<i>Porophyllum ruderales</i> (Jacq.) Cass.	Trilha Paraíso I	Monge, M. 752; Braga, K.R.R.
Inuleae		
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	Trilha Mirante	Monge, M. 779; Braga, K.R.R.
Mutisieae		
<i>Chaptalia interregima</i> (Vell.) Burkart	Estrada sob a rodovia dos Bandeirantes	Monge, M. 761; Braga, K.R.R.
<i>Chaptalia nutans</i> (L.) Pol.	Estrada sob a rodovia dos Bandeirantes	Braga, K.R.R. 98
Nassauvieae		
<i>Trixis antimenorrhoea</i> (Schrank) Kuntze	Estrada para a Base	Braga, K.R.R. 18, 83; Monge, M.; Shimizu, G.
Neuroleneae		
<i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 34, Monge, M.; Shimizu, G.
Senecioneae		
<i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC.	Trilha Mirante	Monge, M. 906; Braga, K.R.R 81.
Tageteae		
<i>Tagetes minuta</i> L	Trilha Mirante	Monge, M. 1106
Vernonieae		
<i>Elephantopus angustifolius</i> SW.	Estrada para a Base	Monge, M. 781; Braga, K.R.R.
<i>Vernonia diffusa</i> Less.	Trilha Paraíso I	Braga, K.R.R. 40; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Vernonia hilariana</i> Less.	Trilha Mirante	Braga, K.R.R. 44; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less.	Trilha Mirante	Monge, M. 763; Braga, K.R.R.
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	Estrada para a Base	Braga, K.R.R. 79
<i>Vernonia remotiflora</i> Rich.	Trilha Mirante	Monge, M. 759; Braga, K.R.R.

Germinação de sementes, pré-tratamento, fixação e armazenamento

Para a realização dos estudos cromossômicos (número e morfologia), frutos (cipselas) de Asteraceae foram postos para germinar em placa de Petri com papel filtro umedecido com água destilada e colocado na Câmara de Germinação, expostas à temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12h. As raízes emergentes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) – solução 0,002M, por 24h a 4°C. Posteriormente, as pontas de raízes foram fixadas em solução Farmer (álcool etílico: ácido acético; 3:1). por 24h em temperatura ambiente (TA). Depois de fixadas, as raízes foram levadas para o freezer e mantidas no próprio fixador até serem confeccionadas as lâminas.

Técnica de Coloração de Giemsa

As preparações citológicas foram obtidas pela técnica convencional de Giemsa (Guerra, 1983). As raízes já fixadas foram lavadas 3 vezes (x) em água destilada, por 5min cada. Depois as raízes foram mergulhas em HCl 5N, em TA, por 20min. Após uma nova lavagem (2x, por 5min) o meristema das mesmas foi retirado e fragmentado em ácido acético 45% diretamente sobre uma lâmina e coberto com lamínula. Com o uso de papel filtro, o conjunto lâmina/lamínula foi comprimido, promovendo o esmagamento do material. Para a retirada da lamínula e fixação do material na lâmina, estas foram mergulhadas em nitrogênio líquido por 3min. Depois de secas em TA, as lâminas foram mergulhas em solução de Giemsa a 2% de 4 a 15min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas em TA e montadas de forma definitiva utilizando uma nova lamínula e resina Entelan (Guerra & Souza, 2002). As contagens cromossômicas foram realizadas, em média, em 20 células por espécie.

Tamanho cromossômico, comprimento total da cromatina – CTC e elaboração do ideograma.

Além da determinação do número cromossômico, também foi calculado o comprimento total da cromatina – CTC (somatório do tamanho individual de todos os cromossomos) para caracterização do cariótipo das espécies estudadas. As medições dos cromossomos foram feitas com o auxílio do programa MicroMeasure 3.3. Foram medidos os cromossomos de cerca de 10 a 20 metáfases por espécie. Para avaliar as diferenças de

CTC entre as espécies foi utilizado o programa de estatística Assistat 7.7 beta para o cálculo da ANOVA.

Para elaboração dos ideogramas foram utilizadas somente células com metáfases adequadas, ou seja, aquelas que apresentaram cromossomos bem espalhados e forma bem definida (Guerra & Souza, 2002). E neste caso, foram consideradas nas medições dos cromossomos o tamanho dos cromossomos, posição centromérica e constrição secundária. Como dados complementares, foram calculados ainda a relação entre braços ($r=l/c$) = braço longo dividido pelo braço curto e o índice de simetria (TF%) = soma do comprimento de todos os braços curtos dividido pelo comprimento total de todos os cromossomos (Huziwara, 1956; Corrêa, 2007). Foram obtidos dados suficientes para a elaboração de ideogramas de 14 espécies. Os pares cromossômicos foram identificados com base no tamanho e na morfologia dos cromossomos. Na confecção dos ideogramas, os cromossomos foram ordenados pelo tamanho, do maior para o menor, conforme a representação apresentada nos trabalhos de Ruas & Aguiar-Perecin (1997) e Corrêa & Forni-Martins (2004). A nomenclatura de morfologia cromossômica adotada neste trabalho foi a de Guerra (1988).

RESULTADOS

Número cromossômico

Ao todo foram coletadas 45 espécies de Asteraceae na Serra do Japi. Entretanto, foi possível determinar o número cromossômico de 35 espécies, as quais estão distribuídas em 14 tribos e 26 gêneros (Tabela 02). As tribos mais bem representadas foram: Eupatorieae (9spp.) (Figura 01), Vernonieae (6spp.) (Figura 02) e Astereae (5spp.) (Figura 03). As demais tribos tiveram de uma a três espécies representadas (Figuras 02g-i, 03f-i e 04). Os gêneros mais amostrados foram: *Vernonia* (5spp.), *Baccharis* (3spp.), *Bidens* (2spp.), *Heterocondylus* (2spp.) e *Chaptalia* (2spp.). Foi observada grande diferença quanto ao número cromossômico. O menor número cromossômico ($2n=16$) foi encontrado em *Youngia japonica* e o maior ($2n=72$) foi encontrado em espécies de *Bidens* (*B. pilosa* e *B. subalternans*).

Dentre as espécies estudadas, o número cromossômico mais frequente foi $2n=20$, presente em cinco espécies: *Symphyotrichum squamatum*, *Critonia megaphylla*, *Grazielia intermedia*, *Trichogoniopsis adenantha* e *Pterocaulon alopecuroides*, pertencentes a três tribos (Astereae, Eupatorieae e Inuleae). Treze espécies, de várias tribos (principalmente Eupatorieae), apresentaram números cromossômicos múltiplos de 10 ($2n=20, 30, 40, \text{ca.}50, 60$). Números cromossômicos múltiplos de 8 ($2n=16, 32, 48, \text{ca.}48 \text{ e } 72$) ocorreram em seis espécies de quatro tribos (principalmente em Cichorieae e Coreopsideae). Em seguida, múltiplos de 9 ($2n=18, 54 \text{ e } \text{ca.}54$) foram encontrados em cinco espécies (quatro na tribo Astereae e um em Nassauvieae). Múltiplos de 17 ($2n=34$) ocorreram em quatro espécies, uma no gênero *Mikania* (tribo Eupatorieae) e três em *Vernonia* (tribo Vernonieae). Outros múltiplos foram observados em menor frequência em tribos diversas, como 11 ($2n=22 \text{ e } 44$) em três espécies, 13 ($2n=26$) em *Taraxacum officinale*, 14 ($2n=28$, duas espécies) e 19 ($2n=38$) em *Calea pinnatifida* (Tabela 02).

Tamanho cromossômico e comprimento total da cromatina - CTC

Foram encontrados tamanhos cromossômicos variados entre as espécies, sendo observado o menor valor em *Heterocondylus vitalbae* ($0,62 \mu\text{m}$) e o maior em *Chaptalia nutans* ($3,5 \mu\text{m}$). Tais variações refletiram na variação do tamanho do CTC, o qual variou de $23,18 \mu\text{m}$ em *Baccharis punctulata* ($2n=18$) a $94,0 \mu\text{m}$ em *C. nutans* ($2n=\text{ca.}50$) (Tabela 02). As tribos mais abundantes (Eupatorieae, Vernonieae e Astereae) também apresentaram diferenças significativas para os valores de CTC entre as espécies estudadas (Figura 05). A maior variação interespecífica foi encontrada na tribo Eupatorieae (Figura 05a), seguida de Vernonieae (Figura 05b) e Astereae (Figura 05c). Dentre os gêneros mais abundantes, em *Vernonia* foi encontrada variação interespecífica, enquanto que em *Baccharis* não foram encontradas diferenças para os valores de CTC entre as espécies (Figura 05c).

Ideogramas

Ideogramas foram elaborados para 14 espécies: *Chromolaena odorata*, *Grazielia intermedia*, *Mikania* sp., *Praxelis kleineoides* e *Trichogoniopsis adenantha* (Figura 06); *Sonchus oleraceus*, *Taraxacum officinale*, *Baccharis dracunculifolia*, *B. punctulata* e

Symphyotrichum squamatum (Figura 07); *Vernonia hilariana*, *Pterocaulon alopecuroides*, *Tagetes minuta*, *Trixis antimenorrhoea* (Figura 08).

Os ideogramas revelaram algumas diferenças entre as espécies (Tabela 02). As espécies apresentaram número variado de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, exceto *Grazielia intermedia* (2n=20) e *Tagetes minuta* (2n=48) que apresentaram apenas cromossomos metacêntricos (Figura 06b) ou submetacêntricos (Figura 08c), respectivamente. Foi observado predomínio de cromossomos metacêntricos em *Baccharis dracunculifolia* (2n=18, Figura 07c), *B. punctulata* (2n=18, figura 07d), *Symphyotrichum squamatum* (2n=20, Figura 07e); *Vernonia hilariana* (2n=34, Figura 08a) e *Pterocaulon alopecuroides* (2n=20, Figura 08b). Nas demais espécies houve predomínio de cromossômicos submetacêntricos.

Em relação ao índice de simetria TF%, no presente estudo variou de 29 na espécie *Praxelis kleineoides* (2n=30) a 44 em *G. intermedia* (DC.) R.M. King & H. Rob. (2n=20) (Tabela 02). Esses valores extremos ocorrem dentro de uma mesma tribo (Eupatorieae). Dessa forma, os cariótipos das espécies estudadas podem ser considerados moderadamente simétricos.

Tabela 02- Características cariotípicas de espécies de Asteraceae amostradas na Serra do Japi: número cromossômico diploide (2n), comprimento total da cromatina (CTC), variação do tamanho cromossômico, índice de simetria (TF%) e fórmula cariotípica (m=metacêntrico; sm=submetacêntrico). * = contagem inédita. **Dado diferente da literatura.

TRIBOS/ESPÉCIES		CTC (μ m)	Tamanho (μ m)	TF%	Fórmula cariotípica
Astereae (3gen.; 5 spp.)					
<i>Baccharis anomala</i> DC.	18	38,78	1,73-2,64	-----	-----
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	18	25,99	0,99-1,72	43	6m + 3sm
<i>Baccharis punctulata</i> A.P. DC.	18	23,18	1,22-1,75	40	5m + 4sm
<i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho	ca. 54	54,6	0,71-1,53	-----	-----
<i>Symphyotrichum squamatum</i> (Spreng.) G.L. Nesom	20*	32,63	1,14-2,32	40	8m + 2sm
Cichorieae (3 gen.; 3spp.)					
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	32	40,59	0,87-2,27	30	8m + 8sm
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg	26	38,07	0,79-1,90	39	8sm + 5m
<i>Youngia japonica</i> (Lam.) DC.	16	38,65	0,86-2,12	-----	-----
Coreoideae (1 gen.; 2 spp.)					
<i>Bidens pilosa</i> L.	72	69,76	0,77-1,41	-----	-----
<i>Bidens subalternans</i> DC.	72**	74,99	0,78-1,96	-----	-----
Eupatorieae (8 gen ; 9 spp.)					
<i>Austroeupatorium</i> sp. R.M. King & H. Rob.	40	92,47	1,01-3,12	-----	-----
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	30**	44,59	0,71-2,44	40	9sm + 6m

<i>Critonia megaphylla</i> (Baker) R.M. King & H. Rob.	20*	40,74	1,24-2,97	-----	-----
<i>Grazielia intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	20	34,23	1,33-2,19	44	10m
<i>Heterocondylus alatus</i> (Vell.) R.M. King & H. Rob.	30*	67,11	1,22-3,34	-----	-----
<i>Heterocondylus vitalbae</i> (DC.) R. M. King & H. Rob.	40	49,65	0,62-1,79	-----	-----
<i>Mikania</i> sp.	34	51,03	1,01-2,78	31	16sm + 1m
<i>Praxelis kleineoides</i> (H.B.K.) R.M. King & H. Rob.	30**	25,24	0,78-1,36	29	13sm + 2m
<i>Trichogoniopsis adenantha</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.	20*	24,79	0,95-1,57	41	6sm + 4m
Gnaphalieae (1sp.; 1 sp.)					
<i>Achyrocline satuerioides</i> (Lam.) DC.	28	42,37	0,95-2,25	-----	-----
Gochnatieae (1 gen. ; 1 sp.)					
<i>Gochnatia barrosii</i> Cabrera	44*	46,10	0,65-1,80	-----	-----
Helenieae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Porophyllum ruderales</i> (Jacq.) Cass.	44	38,91	1,53-1,9	-----	-----
Inuleae (1 gen. ; 1 sp.)					
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	20	28,28	1,29-1,67	41	9m + 1sm
Mutisieae (1 gen. ; 2 spp.)					
<i>Chaptalia interregima</i> (Vell.) Burkart	ca. 48	73,49	0,84-1,45	-----	-----
<i>Chaptalia nutans</i> (L.) Pol.	ca. 50	94,0	1,2-3,5		
Nassauvieae (1 gen. ; 1 sp.)					
<i>Trixis antimenorrhoea</i> (Schrank) Kuntze	54	82,01	0,77-2,31	31	22sm + 5m
Neuroleneae (1 gen. ; 1 sp.)					
<i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	38	53,85	0,82-2,54	-----	-----
Senecioneae (1 gen.; 1 sp)					
<i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC.	40	59,56	0,99-1,96	-----	-----
Tageteae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Tagetes minuta</i> L	48	56,00	0,82-2,09	30	24sm
Vernonieae (2gen., 6spp.)					
<i>Elephantopus angustifolius</i> SW.	22	23,49	0,79-1,27	-----	-----
<i>Vernonia diffusa</i> Less.	34**	34,83	0,71-1,97	-----	-----
<i>Vernonia hilariana</i> Less.	34*	48,65	0,84-2,32	43	13m + 4sm
<i>Vernonia platensis</i> (Spreng.) Less.	60	87,16	0,65-2,18	-----	-----
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	34	59,89	0,76-2,29	-----	-----
<i>Vernonia remotiflora</i> Rich.	28	29,76	0,76-1,3	-----	-----

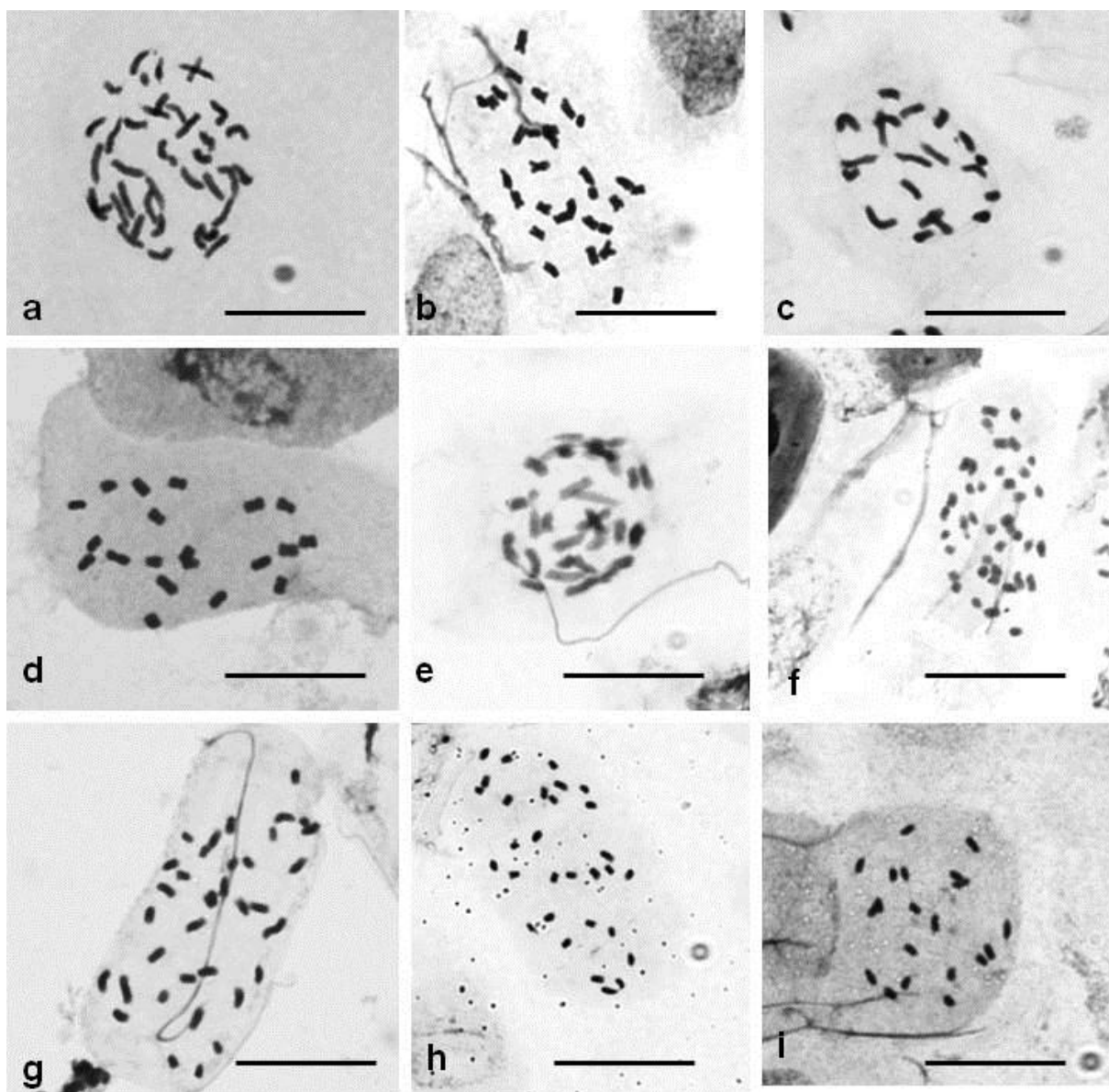


Figura 01– Metáfases mitóticas de espécies de Astereceae, pertencentes à tribo Eupatorieae: **a)** *Austroeupatorium* sp. ($2n=40$), **b)** *Chromolaena odorata* ($2n=30$), **c)** *Critonia megaphylla* ($2n=20$), **d)** *Grazielia intermedia* **e)** *Heterocondylus alatus* ($2n=30$), **f)** *H. vitalbae* ($2n=40$), **g)** *Mikania* sp. ($2n=34$), **h)** *Praxelis kleineoides* ($2n=30$), **i)** *Trichogoniopsis adenantha* ($2n=20$). Coloração por Giemsa. Barra= 10 μ m.

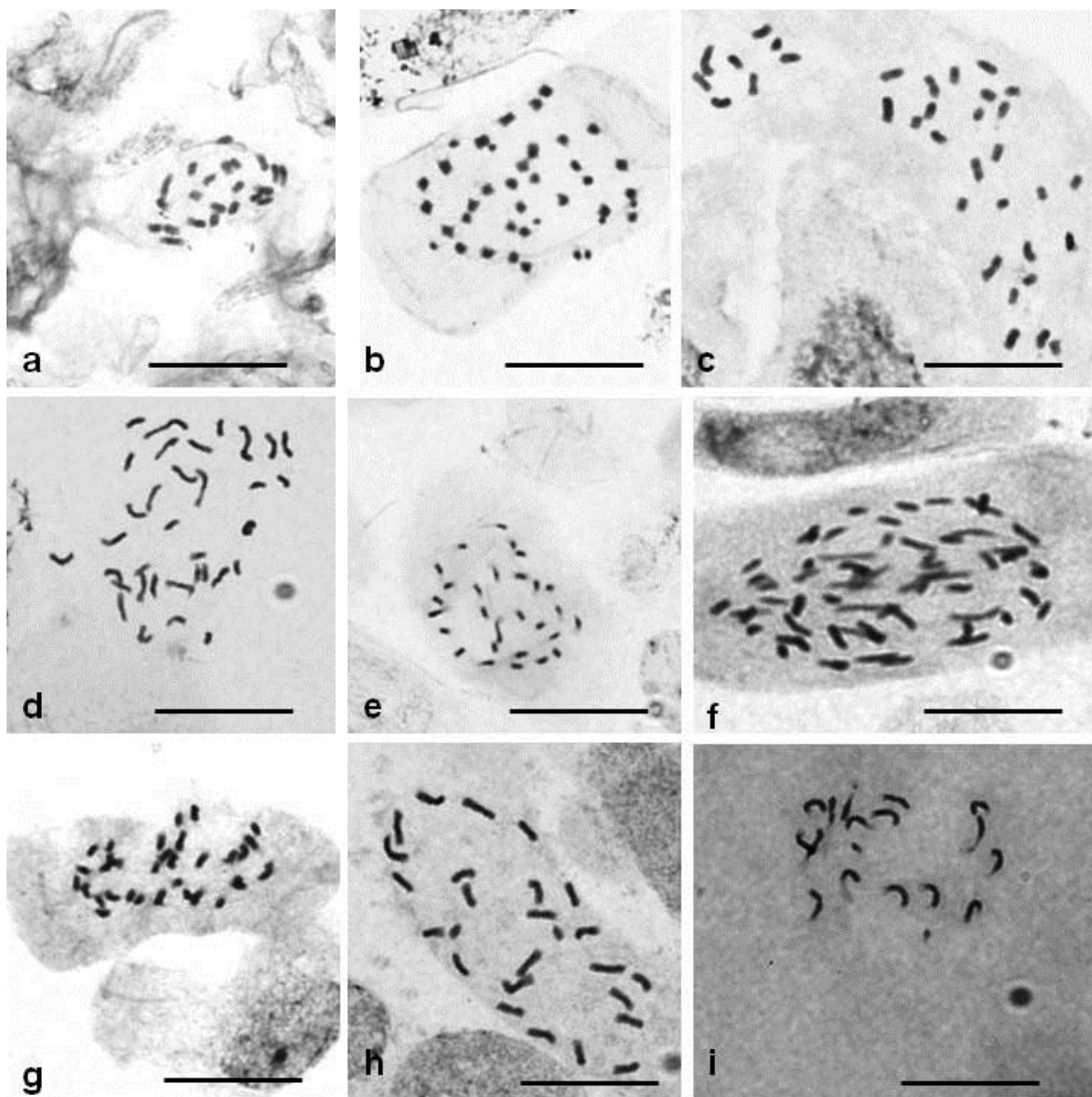


Figura 02 – Metáfases mitóticas de espécies de Astereceae, pertencentes às tribos Vernoniaceae (**a-f**) e Cichorieae (**g-i**): **a)** *Elephantopus angustifolius* ($2n=22$), **b)** *Vernonia diffusa* ($3n=34$), **c)** *V. hilariana* ($2n=34$), **d)** *V. polyanthes* ($2n=34$), **e)** *V. remotiflora* ($2n=28$), **f)** *V. platensis* ($2n=60$), **g)** *Sonchus oleraceus* ($2n=32$), **h)** *Taraxacum officinale* ($2n=26$), **i)** *Youngia japonica* ($2n=16$). Coloração por Giemsa. Barra= 10μm.

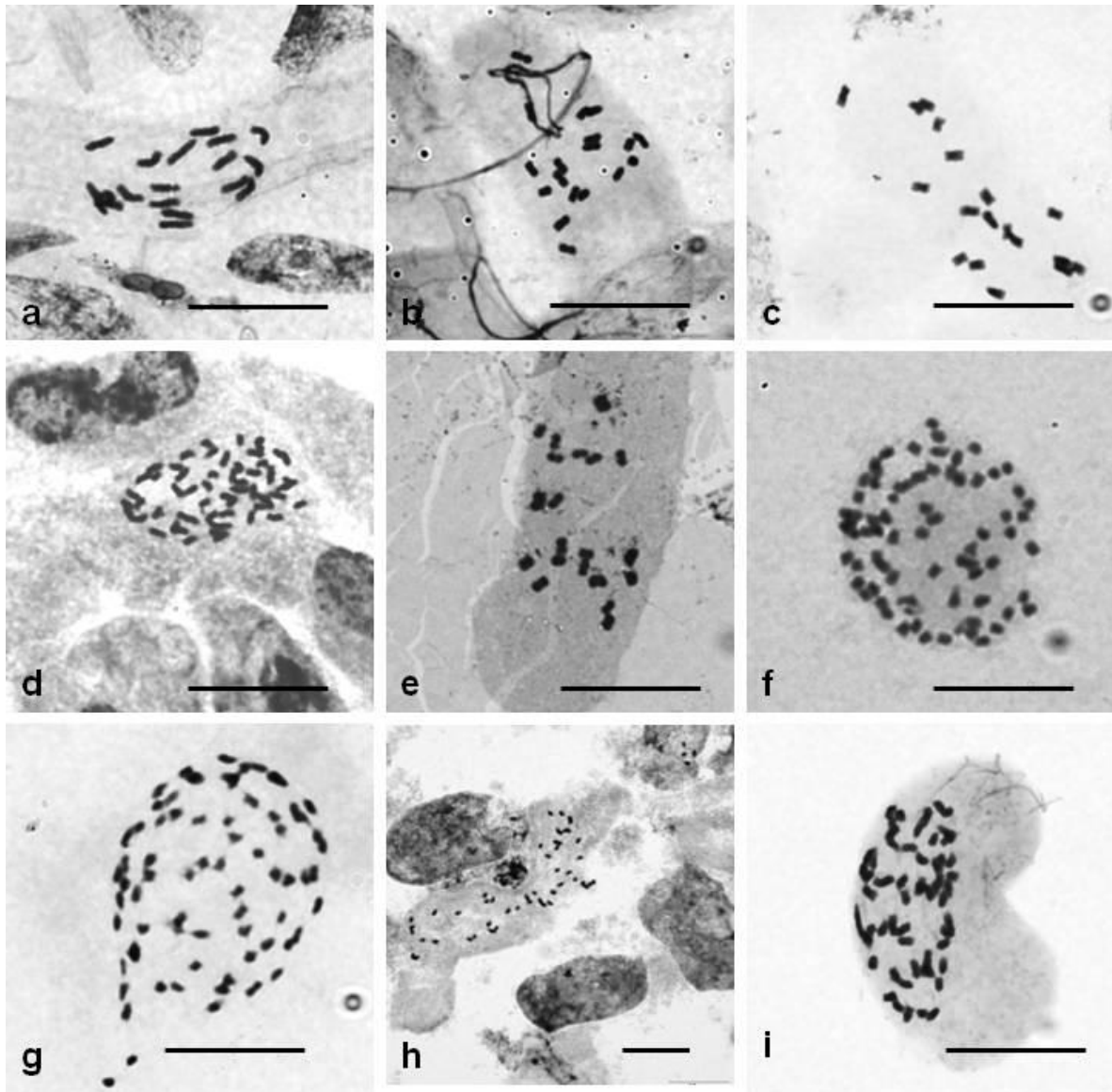


Figura 03 – Metáfases mitóticas de espécies de Astereaceae, pertencentes às tribos Astereae (a-e), Coreopsideae (f-g) e Mutisieae (h-i): a) *Baccharis anomala* ($2n=18$), b) *B. dracunculifolia* ($2n=18$), c) *B. punctulata* ($2n=18$), d) *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* ($2n=54$), e) *Symphyotrichum squamatum* ($2n=20$), f) *Bidens pilosa* ($2n=72$), g) *B. subalternans* ($2n=72$), h) *Chaptalia interregima* ($2n=48$), i) *C. nutans* ($2n=50$). Coloração por Giemsa. Barra= $10\mu\text{m}$.

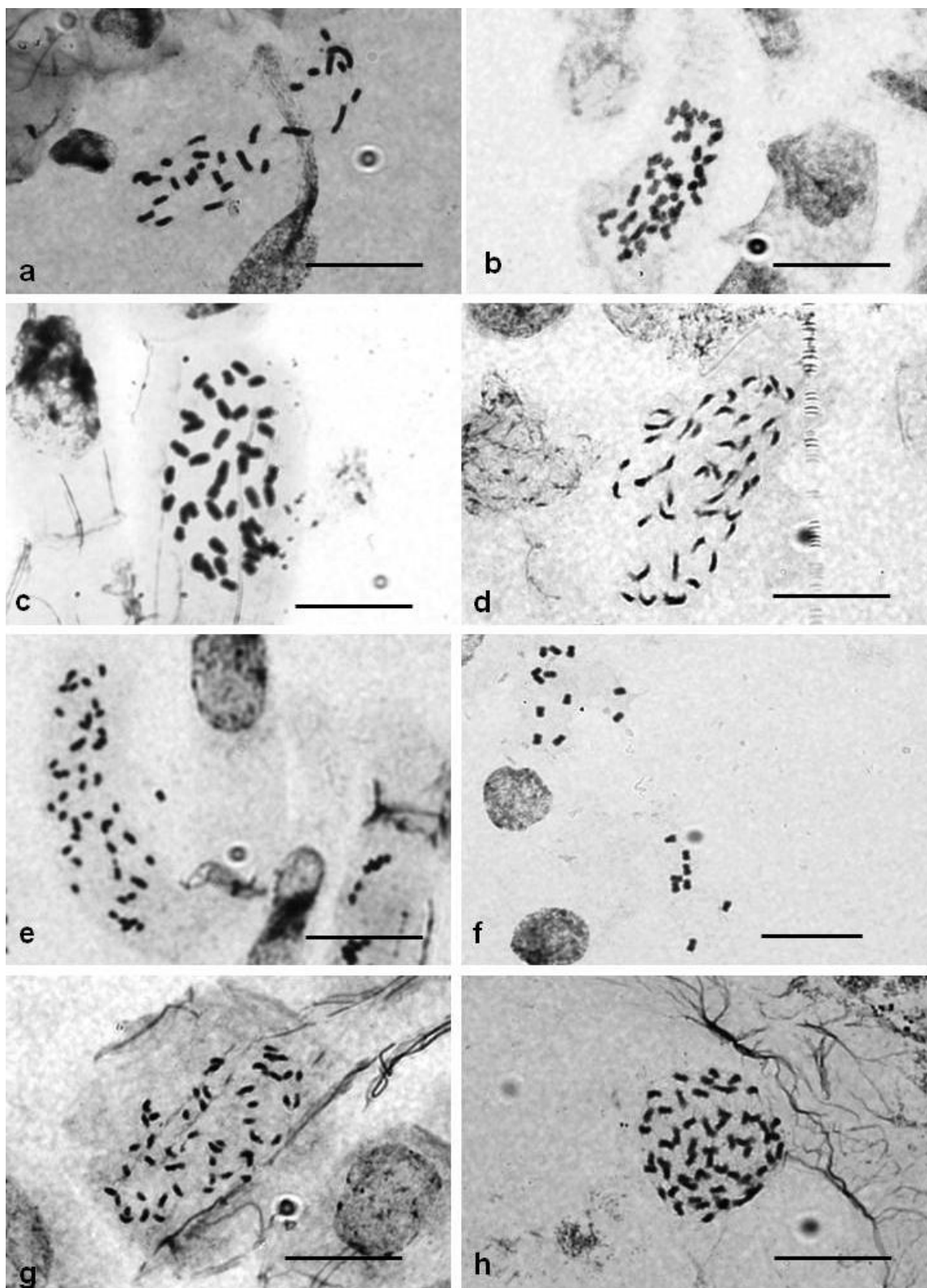


Figura 04- Metáfases mitóticas de espécies de Asteraceae: **a)** *Achyrocline satuerioides* ($2n=28$), **b)** *Calea pinnatifida* ($2n=38$), **c)** *Erechtites valerianifolius* ($2n=40$), **d)** *Gochnatia barrosii*, **e)** *Porophyllum ruderale*, **f)** *Pterocaulon alopecuroides* ($2n=20$), **g)** *Tagetes minuta* ($2n=48$), **h)** *Trixis antimenorrhoea* ($2n=54$). Coloração por Giemsa. Barra= 10 μ m.

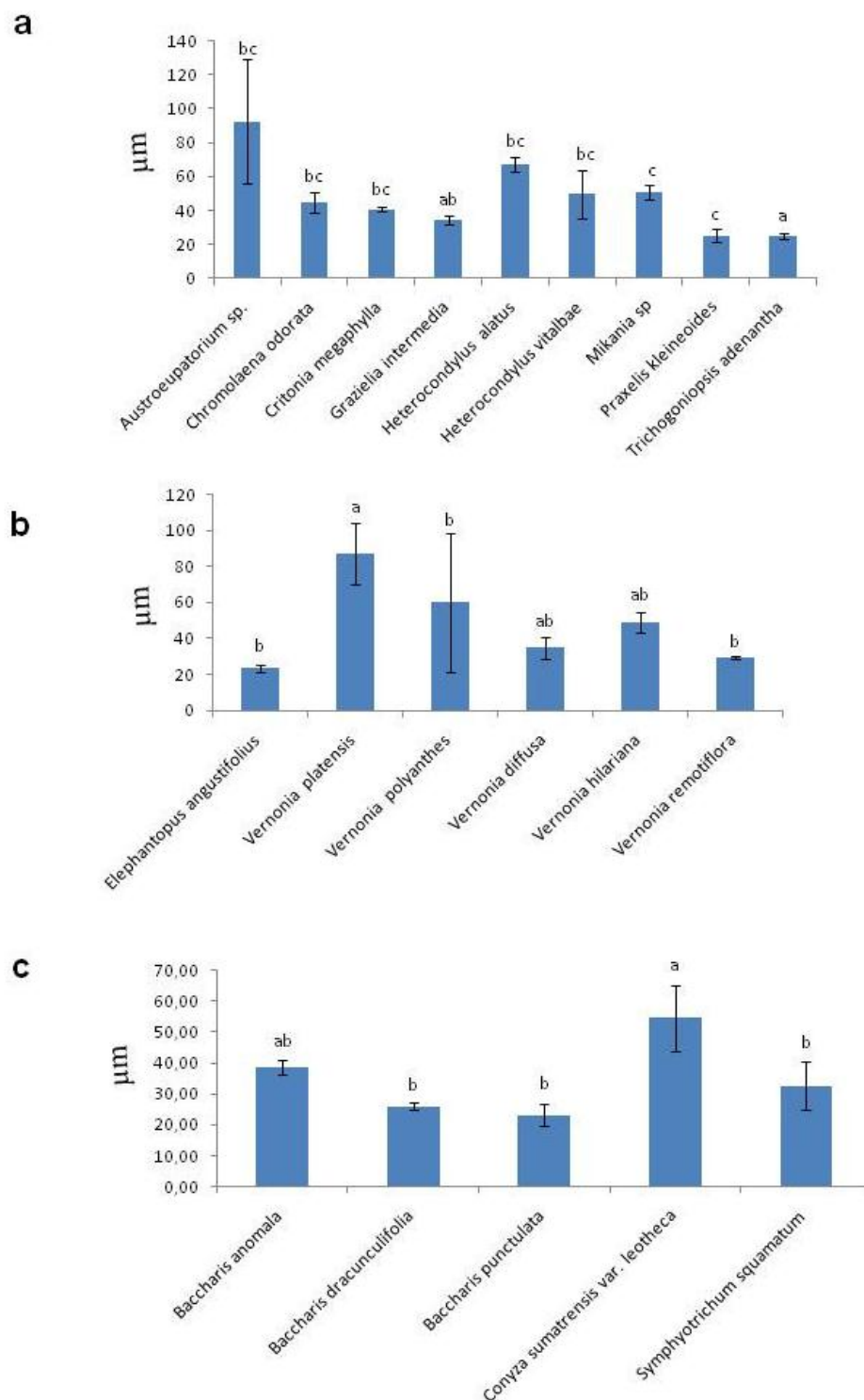


Figura 05 -Comprimento total da cromatina (CTC) de espécies de Asteraceae das tribos: **a)** Eupatorieae (9spp.), **b)** Vernonieae (6spp.) e **c)** Astereae (5spp.).

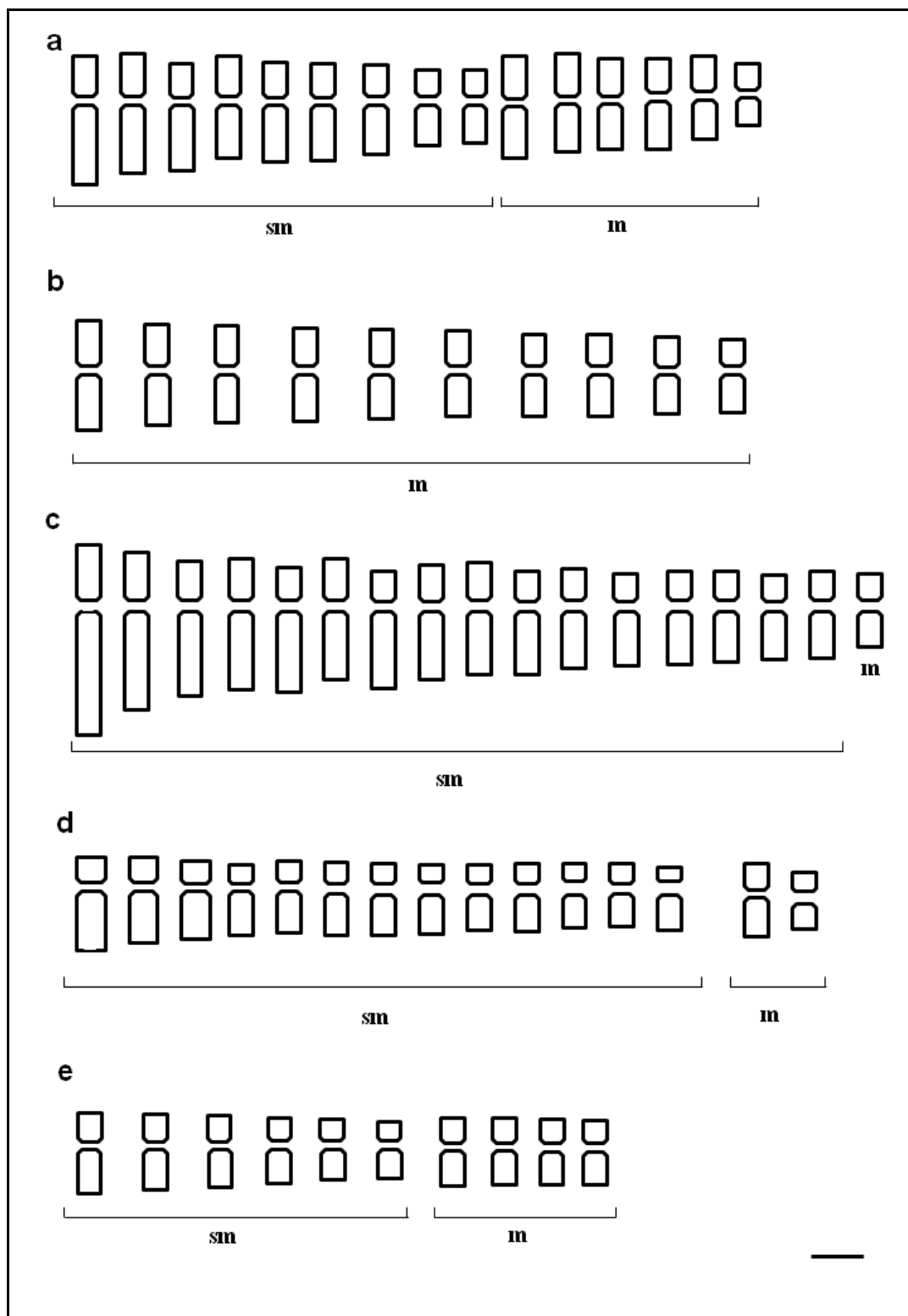


Figura 06 – Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes à tribo **Eupatorieae**: **a)** *Chromolaena odorata* ($2n=30$); **b)** *Grazielia intermedia* ($2n=20$); **c)** *Mikania* sp. ($2n=34$); **d)** *Praxelis kleinoides* ($2n=30$); **e)** *Trichogoniopsis adenantha* ($2n=20$). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1µm.

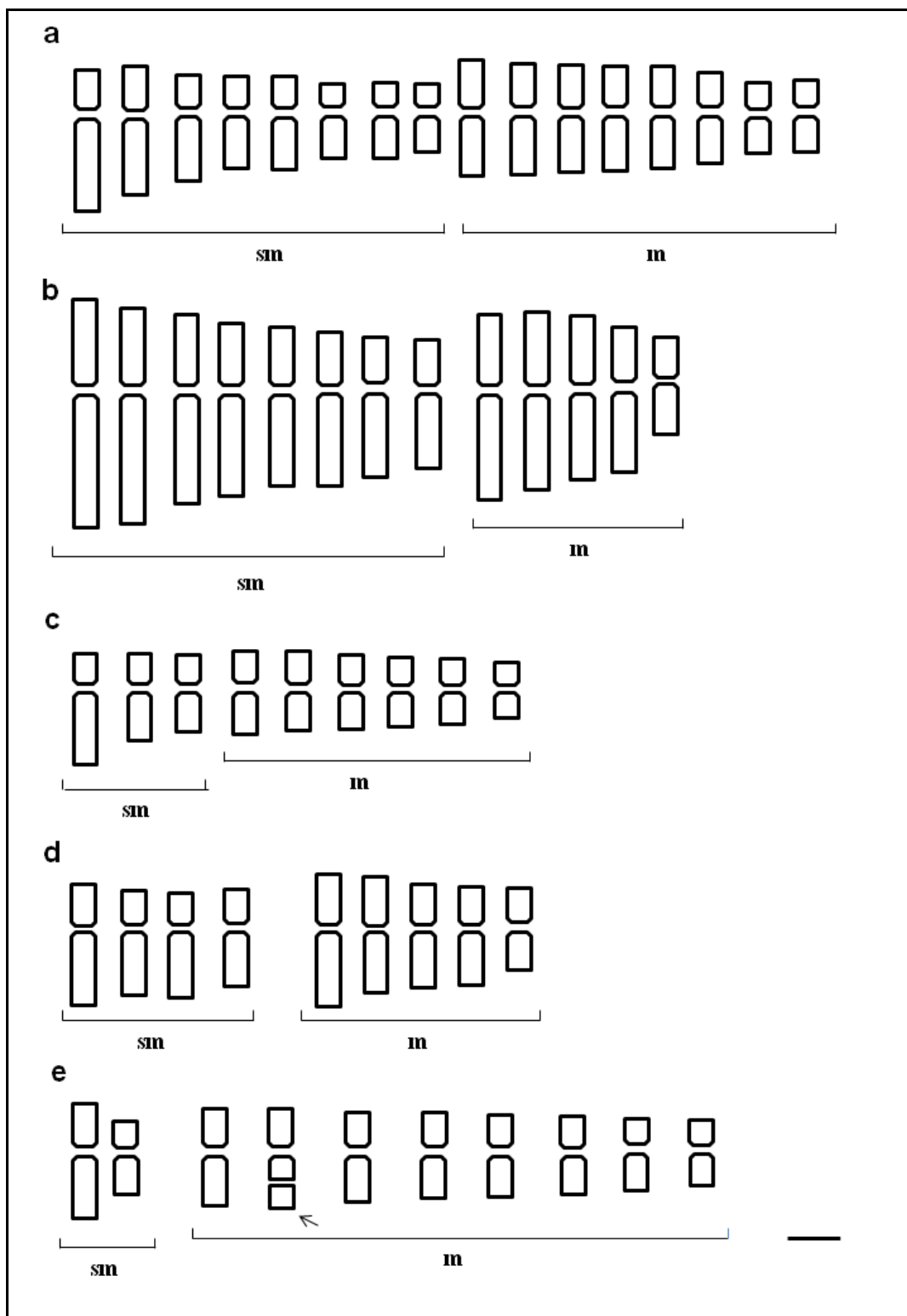


Figura 07 – Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes tribo **Cichorieae** (a-b) e **Astereae** (c-e): **a)** *Sonchus oleraceus* ($2n=32$); **b)** *Taraxacum officinale* ($2n=26$); **c)** *Baccharis dracunculifolia* ($2n=18$); **d)** *B. punctulata* ($2n=18$); **e)** *Symphyotrichum squamatum* ($2n=20$) (seta indicando satélite). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1 μ m.

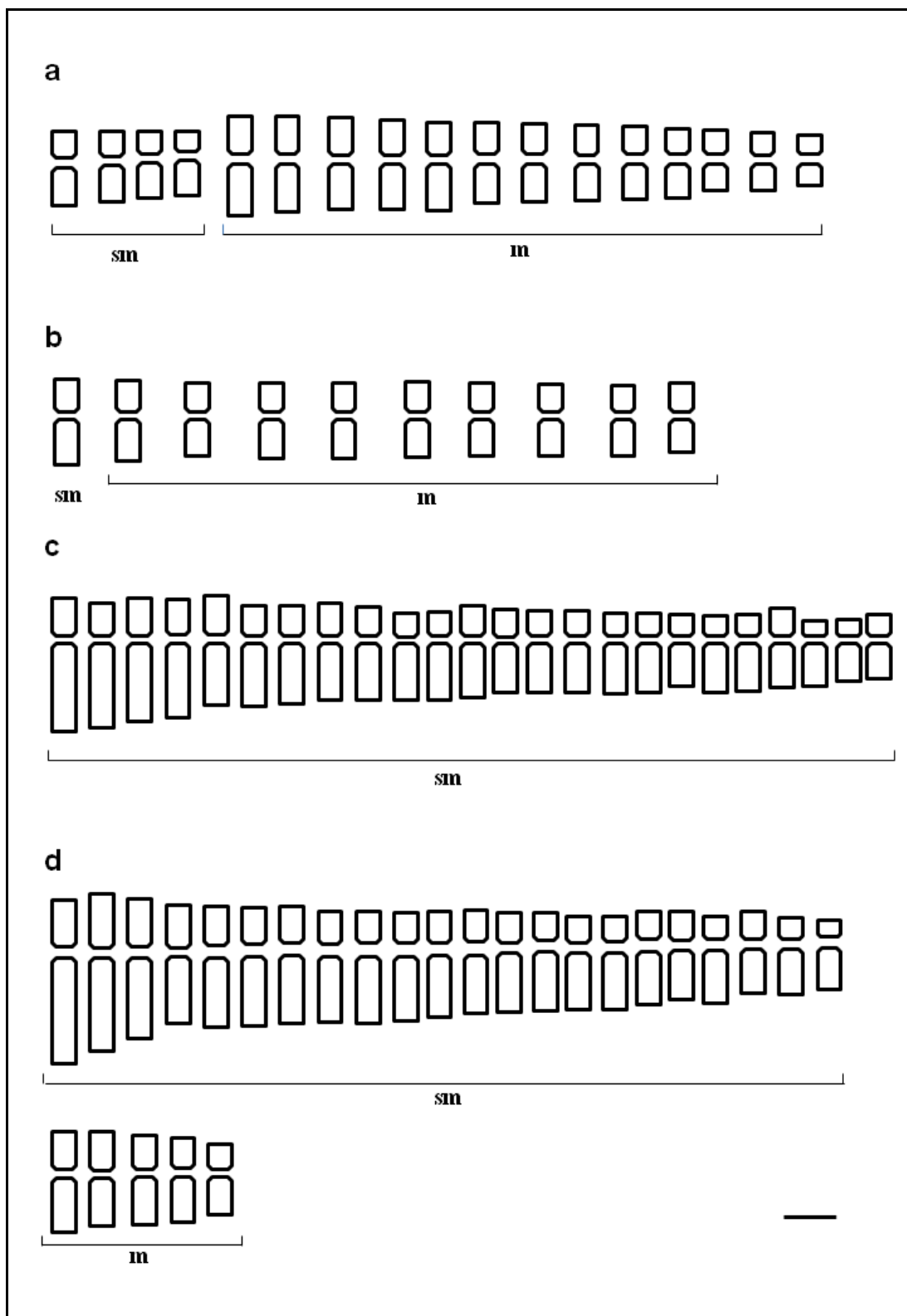


Figura 08 – Ideogramas de espécies de Asteraceae, pertencentes tribo **Vernonieae** (a), **Inuleae** (b), **Tageteae** (c) e **Nassauvieae** (d): a) *Vernonia hilariana* ($2n=34$); b) *Pterocaulon alopecuroides* ($2n=20$); c) *Tagetes minuta* ($2n=48$); d) *Trixis antimenorrhoea* ($2n=54$). sm=submetacêntrico, m=metacêntrico. Barra 1 μ m.

DISCUSSÃO

Comparando os últimos levantamentos florísticos realizados na Serra do Japi (Lombardi *et al.*, 2012; Monge & Semir, 2012), com o presente estudo, nossa lista incrementou dez novas ocorrências de espécies de Asteraceae: *Baccharis anomala*, *B. punctulata*, *Symphyotrichum squamatum*, *Chromolaena odorata*, *Heterocondylus vitalbae*, *Praxelis kleineoides*, *Chaptalia interregima*, *Elephantopus angustifolius*, *Vernonia platensis* e *V. remotiflora* (Tabela 02). Com efeito, somando o montante das novas ocorrências de Asteraceae com a lista apresentada por Monge & Semir (2012), até o momento foram amostradas 100 espécies de Asteraceae na Serra do Japi. Isso evidencia a importância da Serra do Japi para a conservação da biodiversidade por compreender elevada riqueza de espécies, não apenas de representantes da família Asteraceae, como também de outros grupos vegetais e animais (Leitão-Filho & Morellato 1997; Vasconcellos-Neto, *et al.* 2012).

Dentre as 35 espécies estudadas, as contagens cromossômicas são inéditas para seis: *Symphyotrichum squamatum* (2n=20), *Critonia megaphylla* (2n=20), *Heterocondylus alatus* (2n=30), *Trichogoniopsis adenantha* (2n=20), *Gochnatia barrosii* (2n=44) e *Vernonia hilariana* (2n=34).

Os resultados de contagem cromossômica em 25 espécies confirmam publicações anteriores: *Baccharis anomala* (2n=18, Ruas *et al.*, 1989), *B. punctulata* (2n=18, Carr *et al.*, 1999), *B. dracunculifolia* (2n=18, Coleman, 1982), *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* (2n= ca. 54, Urdampilleta, 2005), *Youngia japonica* (2n=16, Nishikawa, 1984), *Sonchus oleraceus* (2n=32, Arohonka, 1982), *Taraxacum officinale* (2n=26, Kliphuis & Wieffering, 1979), *Grazielia intermedia* (2n=20, Robinson *et al.*, 1989), *Heterocondylus vitalbae* (2n=40, King *et al.*, 1976), *Mikania* sp. (2n=34, Ruas & Aguiar-Perecin, 1989), *Austroeupatorium* sp. (2n= 40, Watanabe *et al.*, 1995), *Achyrocline satyroides* (2n=28, Jansen *et al.*, 1984), *Porophyllum ruderale* (2n=44, Molero, 2002), *Bidens pilosa* (2n= 72, Banerjee, 1971), *Calea pinnatifida* 2n=38, *Pterocaulon alopecuroides* 2n=20 e *Chaptalia interregima* 2n= 48 (Coleman, 1968), *C. nutans* (2n= 50, Teppner, & Tropper. 1984), *Trixis antimenorrhoea* (2n=54, Powell *et al.*, 1974), *Erechtites valerianifolius* (2n=40, Jansen *et al.*, 1984), *Tagetes minuta* (2n=48, Renard *et al.*, 1983), *Elephantopus angustifolius* (2n=22,

Jones, 1979), *Vernonia platensis* (2n=60, Dematteis, 1997), *V. polyanthes* (2n=34, Ruas *et al.*, 1991) e *V. remotiflora* (2n=28, Dematteis, 1996).

Apenas em quatro espécies foram encontrados valores discordantes de publicações anteriores: 2n=72 em *Bidens subalternans* (2n=48, Renard *et al.*, 1983), 2n=30 em *Praxelis kleineoides* (2n=40, Robinson *et al.*, 1989), 2n=30 em *Chromolaena odorata* (2n=60, Feng, 2006; 2n=50, Watanabe *et al.*, 1995) e 2n=34 em *Vernonia diffusa* (n=18, Coleman, 1968). Tais diferenças na contagem dessas espécies indicam a existência de citótipos poliploides, tendo em vista que os valores de 2n encontrados são múltiplos dos valores de x apontados para os gêneros supracitados, a saber x=12, 10, 10 e 17, respectivamente.

Para todas as espécies, os ideogramas são inéditos. Os dados cariotípicos seguem o padrão geral de tamanho e forma de outras espécies de Asteraceae já estudadas, como no gênero *Vernonia* (Oliveira *et al.*, 2007a,b) e *Mikania* (Ruas & Aguiar-Perecin, 1997), onde os cromossomos são preferencialmente metacêntricos e têm tamanho variando de 0,9 a 4,6µm. Ruas & Aguiar-Perecin (1997) observaram que a diferença de tamanho entre o primeiro e o segundo par de cromossomos das espécies diplóides de *Mikania* (*M. punctata*, *M. additicia* e *M. hastato-cordata*) era constante nas espécies estudadas e, portanto, foi considerada uma característica citogenética marcante para as mesmas.

Considerando o índice de simetria TF%, os cariótipos das espécies estudadas podem ser considerados moderadamente simétricos, uma vez que apresentaram valores de TF% variando de 29 a 44 (Tabela 02). Não é possível diferenciar as tribos amostradas pelo índice de simetria cariotípica, pois os valores extremos ocorrem numa mesma tribo (Eupatorieae). A simetria máxima é alcançada quando TF%=50, o que ocorreria se todos os cromossomos apresentassem formas metacêntricas, com os braços (longos e curtos) medindo exatamente o mesmo comprimento. Em contrapartida, valores mais baixos de TF% indicariam assimetria, relacionados ao deslocamento do centrômero para posição mais terminal em alguns cromossomos (Oliveira, Forni-Martins & Semir, 2007ab). Existe uma tendência das angiospermas evoluírem para um padrão assimétrico do conjunto cromossômico (Ruas & Aguiar-Percin, 1997).

Há poucos trabalhos abordando o índice TF% em espécies de Asteraceae. Oliveira *et al.* (2007a,b; 2011a,b) estudaram espécies de *Vernonia* e encontraram variação de TF% entre populações de *V. polyanthes* Less., com 42, 3 na população 3 (Analândia-SP) e 44.4

na população 1 (Campinas-SP), apenas com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Mansanares (2004), estudando três espécies de *Lychnophora* com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos; obtiveram TF% variando de 41,26 em *L. markgravii* a 42,34 em *L. rosmarinifolia*.

A discussão sobre o cariótipo, principalmente sobre número cromossômico, além de algum detalhamento do tamanho e forma dos cromossomos das espécies estudadas será apresentada em relação às tribos em que elas ocorrem.

Tribo Eupatorieae

Foram registradas três contagens inéditas, em *Critonia megaphylla* ($2n=20$), *Heterocondylus alatus* ($2n=30$) e *Trichogoniopsis adenantha* ($2n=20$).

Os dados de duas espécies discordaram de publicações anteriores, $2n=30$ em *Praxelis kleinoides* ($2n=40$, Robinson *et al.*, 1989) e $2n=30$ em *Chromolaena odorata* ($2n=60$; Feng, 2006). Em relação a *C. odorata* há ainda dois registros, o de Gill & Omoigui (1992) onde os autores observaram $2n=30$ e o de King *et al.* (1976), no qual os pesquisadores encontraram dois valores ($2n=30$ e $2n=60$) para espécie. Diante desses dados para *C. odorata*, sugere-se que o valor de $2n=60$ seja um citótipo. Considerando ainda que o número básico da tribo seja $x=10$, sugere-se que o valor de $2n=60$ seja um citótipo hexaplóide, $2n=6x=60$.

A verificação de citótipos numa espécie tem, antes de tudo, uma importância evolutiva porque é um indicativo que a espécie tem passado por uma acentuada evolução cariotípica. Com efeito, através da caracterização dos citótipos é possível inferir linhagens evolutivas na espécie (Sarria-Perea & Duarte, 2009). A partir de novos números cromossômicos oriundos de eventos de disploidia e autopoliploidia, tais linhagens poderão divergir ao longo do tempo. A diferenciação de números cromossômicos pode se configurar numa barreira a cruzamentos entre os citótipos, consequentemente levar a um processo de “isolamento reprodutivo” até formar novas espécies.

Em nosso estudo todas as espécies apresentaram número básico $x=10$, com exceção de *Mikania* sp. que apresentou $2n=34$ ($x=17$). O número básico $x=17$ é um dos citados para a subtribo Mikaniinae. As outras espécies são enquadradas em subtribos com $x=10$

(Critoniinae, Eupatoriinae e Praxelinae). Portanto, as espécies aqui estudadas apresentam números cromossômicos concordantes com o número básico das subtribos (Figura 09).

Vários números básicos têm sido apontados para a tribo Eupatorieae, variando de $x=4$ a 25. Contudo, o número básico mais abundante na tribo é $x=10$ (Watababe *et al.*, 1995). Em função do predomínio desse número, durante muito tempo se acreditou que $x=10$ fosse um caráter plesiomórfico (King & Robinson, 1987). Só depois do estudo filogenético de Ito *et al.* (2000), utilizando dados de nrDNA ITS e cpDNA RFLP, no qual foi proposta uma nova árvore filogenética para a tribo (Figura 08), é que o número básico $x=10$ passou a ser reconhecido como um estado de caráter derivado, em função de diversas subtribos consideradas derivadas apresentarem $x=10$ (Robinson *et al.*, 2009) (Figura 08).

Números cromossômicos maiores nem sempre refletiram em valores de CTC maiores. Por exemplo, a espécie *Heterocondylus alatus* ($2n=30$) apresentou valor de CTC (67,11 μ m) maior que *H. vitalbae* ($2n=40$ e CTC igual a 49, 65 μ m) (Tabela 02). Isso se deve a diferenças no tamanho cromossômico de cada uma das espécies. Em *H. alatus* os cromossomos são maiores (1,22 a 1,34 μ m) do que em *H. vitalbae* (0,62 a 1,79 μ m) (Figuras 01e e 01f, Tabela 02).

Nos ideogramas elaborados para as cinco espécies da tribo não foi observado um padrão uniforme (Figura 07). Existe variação no tamanho cromossômico, com maior cromossomo em *Grazielia intermedia* (2,19 μ m) e menor em *Critonia megaphylla* (0,71 μ m). Os cromossomos podem ser exclusivamente metacêntricos (*G. intermedia*) ou predominantemente submetacêntricos nas outras duas espécies. A ocorrência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos já havia sido observada no estudo de Ruas & Aguiar-Perecin (1997), desenvolvido especificamente com dez espécies do gênero *Mikania*.

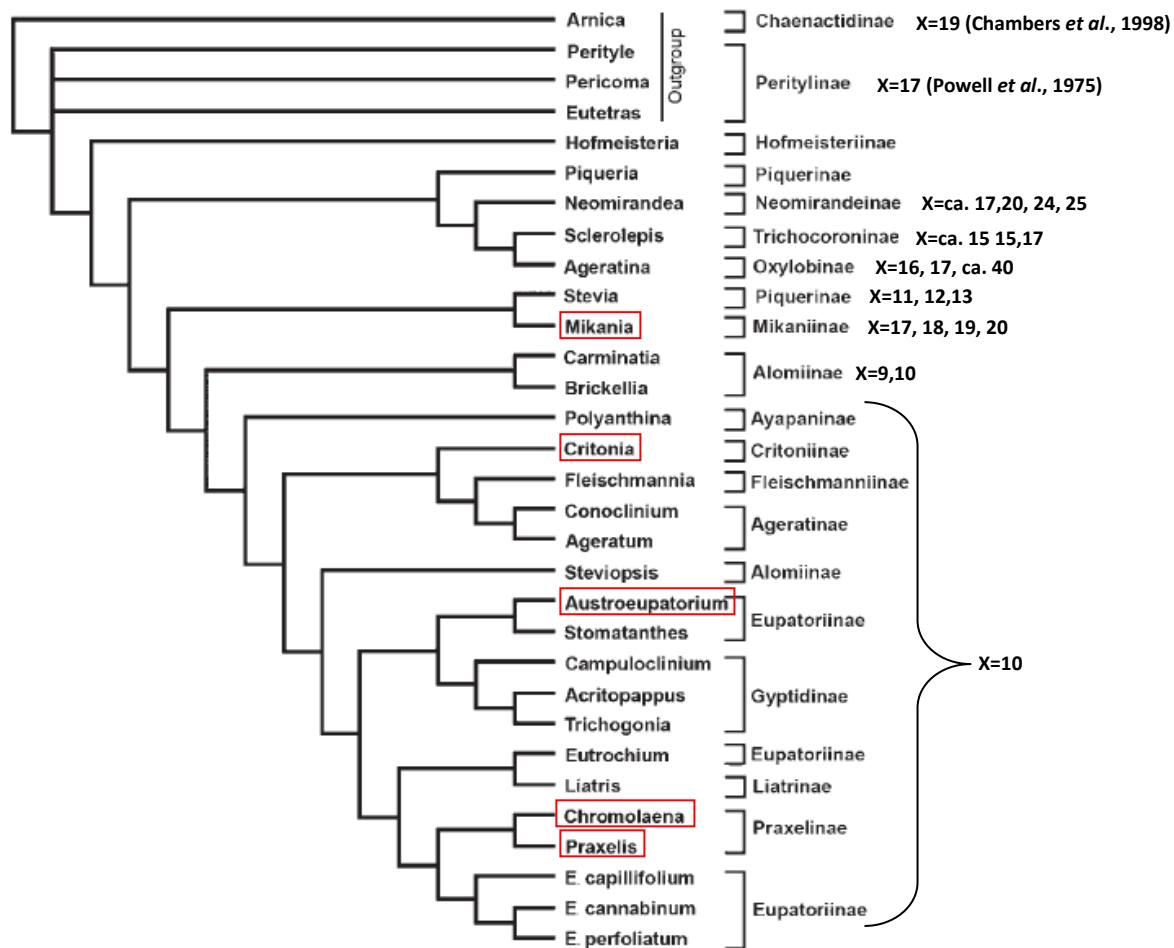


Figura 09 – Árvore filogenética da tribo Eupatorieae (Ito *et al.*, 2000; Robinson *et al.* (2009). Detalhe em vermelho, gêneros amostrados no presente estudo cromossômico e valores de número básico foram acrescentados, de acordo com Robinson *et al.* (2009). Adaptado.

Tribo Vernonieae

Em nosso estudo o gênero *Vernonia* foi o mais bem representado, totalizando cinco espécies, e o número cromossômico $2n=34$ foi o mais frequente (Tabela 02). Entretanto, o número cromossômico em *Vernonia* pode variar de $2n=18$ a $2n=160$ (Oliveira *et al.*, 2007b).

A contagem para *V. hilariana* Less. $2n=34$ é inédita. Embora *Vernonia diffusa* Less. tenha apresentado $2n=34$, nosso dado divergiu do relato de Coleman (1968), que encontrou para mesma espécie $n=18$ ($2n=36$). Essa divergência na contagem cromossômica pode estar associada a eventos de aneuploidia/displóidia, decorrente de alguma alteração estrutural, resultando na diminuição ou no aumento de dois cromossomos. Além disso,

como sugerido por Oliveira *et al.*, (2012a), as pequenas nuances na diferença entre os números cromossômicos dentro da mesma espécie de *Vernonia* podem estar associadas a contagens incorretas devido ao pequeno tamanho dos cromossomos, e/ou a identificações botânicas incorretas, em virtude da complexidade do grupo.

Apesar da riqueza de espécies, o gênero *Vernonia*, com mais de 1000 espécies (Baker, 1873), relativamente pouco estudado do ponto de vista cromossômico, algo em torno de 20% das espécies (Dematteis, 2002).

Robinson (1999) propôs um novo rearranjo para os gêneros de Vernonieae, incluindo a subdivisão de *Vernonia* em 22 gêneros menores. Nessa proposta, *Vernonia* estaria restrito a espécies exclusivamente norte-americanas. Estudos filogenéticos (King *et al.* 1998, Keeley *et al.*, 2007), assim como cromossômicos (Ruas *et al.*, 1991; Dematteis & Fernández, 1998, 2000; Oliveira *et al.* 2007a, b, 2010, 2012a,b), vêm confirmando a heterogeneidade de *Vernonia sensu* Baker. No Novo Mundo, Vernonieae mostra maior diversidade em número de cromossomos e uma maior proporção de espécies poliplóides em comparação com espécies do Velho Mundo (Oliveira *et al.*, 2012a).

Análise citotaxonômica apresentada por Oliveira *et al.* (2010) comparou a distribuição dos números cromossômicos em relação ao arranjo das espécies de *Vernonia* (Baker, 1873) em “grupos” propostos por Bentham (1873a, b) e aos novos gêneros criados por Robinson (1999). Não foi demonstrada clara associação entre os números cromossômicos e os arranjos propostos pelos dois autores, porém foram verificadas algumas tendências. Relações tênues foram observadas para alguns dos novos gêneros, com predomínio de um determinado número cromossômico, como em *Lessigianthus*, *Chrysolaena* e *Vernonanthura* (Oliveira *et al.* 2012b).

De acordo com Robinson (1999), as cinco espécies de *Vernonia* apresentadas nesse estudo estão enquadradas nos gêneros *Vernonanthura*, *Chrysolaena* e *Lepidaploa*. As espécies *Vernonia diffusa* Less., *V. hilariana* Less. e *V. polyanthes* Less., todas $2n=34$, são agora designadas *Vernonanthura diffusa* (Less.) H. Rob., *V. petiolaris* (DC.) H. Rob. e *V. phosphorica* (Vell.) H. Rob. Já a espécie *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. ($2n=60$) está enquadrada como *Chrysolaena platensis* (Spreng.) H. Rob. , enquanto *V. remotiflora* Rich ($2n=28$) é denominada *Lepidaploa remotiflora* (Rich.) H. Rob. Nossos dados apoiam essa

circunscrição, uma vez que os valores de números cromossômicos se distinguem entre os três gêneros propostos por Robinson (Tabela 02).

Entretanto, considerando a proposta de Robinson (1999), nem sempre se observa diferenciação do número cromossômico básico entre os novos gêneros. Por exemplo, em *Lepidaploa*, são mencionados $x=10$, 16 e 17 (Figura 09). Entretanto, pode-se observar predomínio de um determinado número cromossômico, como em *Chrysolaena* ($x=10$), *Lepidaploa* ($x=17$) e *Lessigianthus* ($x=16$) (Keeley & Robinson, 2009). Considerando-se o gênero *Vernonia sensu* Baker, dois números básicos (x) eram apontados, $x=17$ e $x=18$ (Bohlmann & Jakupovic, 1990). Além desses, outros valores já foram encontrados na literatura como $x=10$, 14, 15 e 16 (Dematteis, 2002).

Em nível de subtribo, a subtribo Vernoniinae (onde se insere *Vernonia sensu* Robinson) apresenta uma ampla variação para valores de número básico, a saber, $x=8, 10, 16, 17$ e 18 (Bohlmann & Jakupovic, 1990; Borkosky, 1996). Por outro lado, na subtribo Elephantopinae (aqui representada por *Elephantopus*), o número básico é $x=11$ (Bohlmann & Jakupovic, 1990). Portanto, o número cromossômico de Elephantopinae parece ser um caráter que a separe de outras subtribos, como Vernoniinae, evidenciado na filogenia para tribo Vernonieae (Figura 09).

Para a espécie *Elephantopus angustifolius* SW. ($2n=22$) nosso dado confirma publicação anterior (Jones, 1979). O número $2n=22$ tem se apresentado constante para o gênero *Elephantopus*: *E. mollis* Kunth (Renard *et al.*, 1983; Morton, 1993; Jones, 1979; Peng, & Hsu, 1977), *E. plurisetus* (O. Hoffm.) Clonts (Jones, 1982), *E. scaber* L. (Sarkar *et al.*, 1981), *E. tomentosus* L. (Xie, & Zheng, 2003) e *E. spicatus* Juss. ex Aubl. (Peng, & Hsu, 1977; Keil *et al.*, 1988). Portanto, o número cromossômico de *Elephantopus* coincide com o da subtribo onde está enquadrado.

Foram observadas pequenas diferenças no tamanho dos cromossomos, variando de 0,79 μm em *Vernonia diffusa* a 2,29 μm em *V. hilariana*. Essas diferenças, por sua vez influenciaram nos valores de CTC, os quais variaram de 29, 76 μm em *V. remotiflora* a 87,16 μm em *V. platensis* ($2n=60$). (Figura 02b-f, Figura 05b e Tabela 02). Observou-se ainda que houve uma relação direta entre números cromossômicos e os valores de CTC nas espécies estudadas (Tabela 02). Contudo, isso não parece ser uma tendência para tribo,

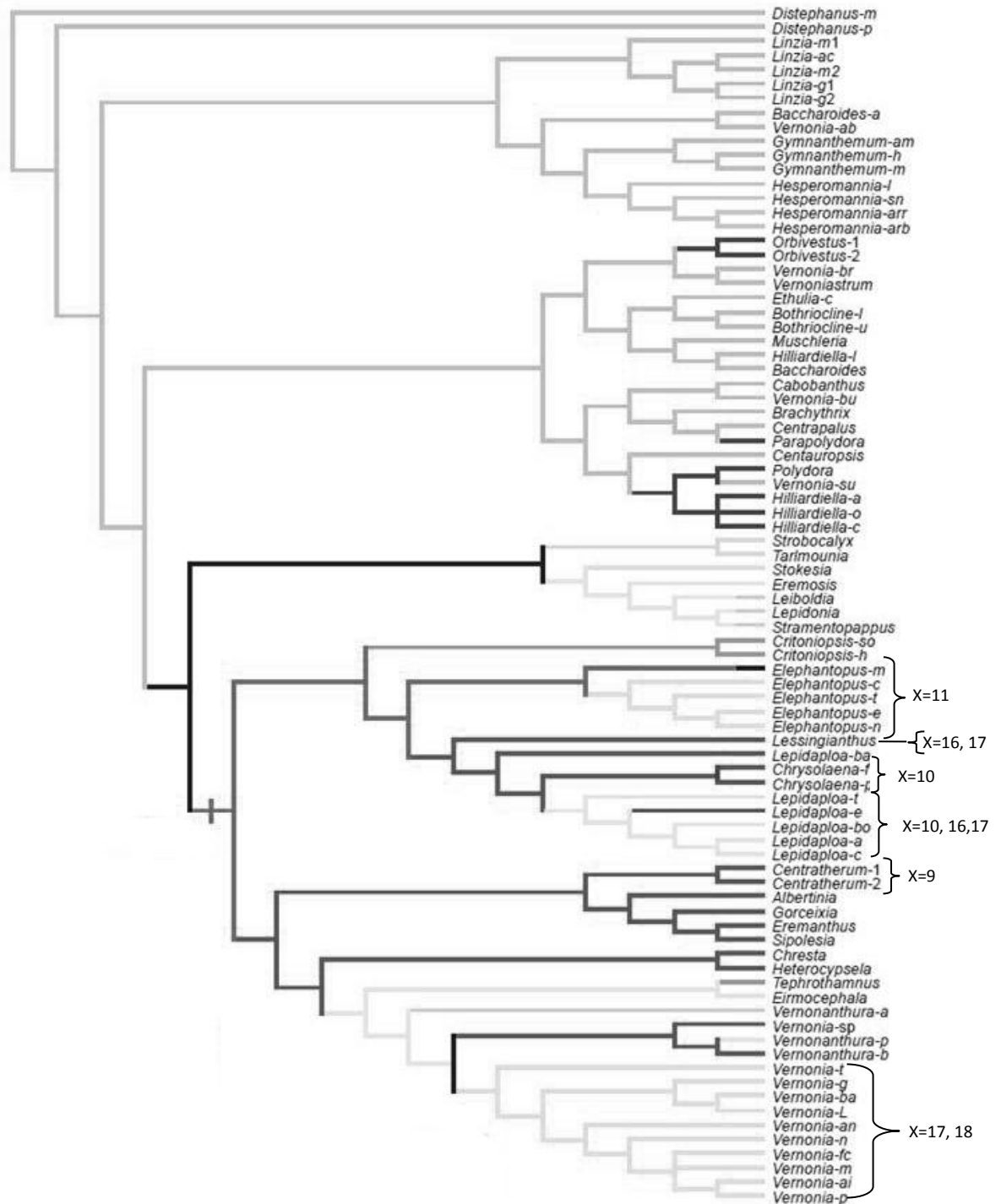


Figura 10 - Filogenia da tribo Vernonieae - construída a partir na Análise Bayesiana de conjuntos combinados de sequências de DNA de STI, ndhF, trnL-F para 90 taxons de Vernonieae (Keeley *et al.* 2007; Keeley, & Robinson, 2009). Os valores de número básico foram acrescidos, de acordo com Keeley, & Robinson (2009). Os ramos de cor cinza indicam representantes do Velho Mundo e os demais ramos se referem a ocorrências no continente americano. Adaptado.

tendo em vista que Oliveira *et al.* (2012) não encontraram uma relação direta entre números cromossômicos e os valores de CTC.

A presença de apenas duas formas cromossômicas (metacêntrico e submetacêntrico) para o gênero *Vernonia* (Figura 05c), já havia sido relatada por Oliveira, *et al.* (2012), bem como o predomínio de cromossomos metacêntricos. A simetria (TF% = 43) encontrada em *Vernonia hilariana* é próxima aos valores apresentados para outras espécies de *Vernonia* por Oliveira *et al.* (2012).

Tribo Astereae

As três espécies de *Baccharis* estudadas nesse trabalho apresentaram número cromossômico $2n=18$ (Tabela 02). Embora o gênero *Baccharis* seja o mais rico em espécies dentro da tribo e o nono entre as Asteraceae (Judd *et al.*, 1999), apenas 15% delas possui contagem cromossômica (Heiden *et al.*, 2006).

Heiden *et al.* (2006) citaram que o número cromossômico $2n=18$ é estável e que fenômenos de aumento e redução do número cromossômico tiveram pouca influência na evolução de *Baccharis*. Desta forma, concluíram se tratar de um gênero com estabilidade cariotípica. Diz-se que o cariótipo é estável quando o seu conjunto cromossômico sofre poucas alterações em número, morfologia e quantidade de DNA (Guerra, 1988).

Em relação aos dados de comprimento total da cromatina-CTC para as espécies de *Baccharis*, nosso estudo revelou que há pouca variação interespecífica, uma vez que, das três espécies estudadas, duas (*B. dracunculifolia* e *B. punctulata*) não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 05c). Assim, reforça a hipótese da estabilidade cromossômica no gênero, agora em relação ao comprimento dos cromossomos.

O ideograma construído para a espécie *B. dracunculifolia* ($2n=18$) (Figura 06a), apresentou as formas cromossômicas: metacêntrico e submetacêntrico, comuns a outras espécies de Asteraceae (Huziwara, Y. 1956; Guerra & Nogueira, 1990; Zhang & Xue-li He, 2010).

Para espécie *Symphyotrichum squamatum* ($2n=20$) a contagem cromossômica aqui apresentada é inédita. Em *Symphyotrichum* há contagem para 19 espécies: *S. ascendens* (Lindl.) G.L. Nesom $2n=26$, 52, *S. campestre* (Nutt.) G.L. Nesom $2n=10$, *S. chilense* (Nees) G.L. Nesom $2n=48$, *S. ciliolatum* (Lindl.) Á. Löve & D. Löve $2n=48$, *S. eatonii* (A. Gray)

G.L. Nesom $2n=16$, *S. ericoides* (L.) G.L. Nesom $2n=10, 20$, *S. falcatum* var. *commutatum* (Torr. & A. Gray) G.L. Nesom $2n=30$, *S. foliaceum* (Lindl. ex DC.) G.L. Nesom $2n=16, 32, 48, 64, 80$, *S. hesperium* (A. Gray) Á. Löve & D. Löve $2n=48$, *S. lanceolatum* subsp. *hesperium* (A. Gray) G.L. Nesom $2n=48, 56, 64$, *S. spathulatum* (Lindl.) G.L. Nesom $2n=16, 64$, *S. yukonense* (Cronquist) G.L. Nesom $2n=10$ (Semple *et al.*, 2001), *S. boreale* (Torr. & A. Gray) Á. Löve & D. Löve $2n=16$, *S. laeve* (L.) Á. Löve & D. Löve $2n=48$, *S. lateriflorum* (L.) Á. Löve & D. Löve $2n=16$, *S. puniceum* (L.) Á. Löve & D. Löve $2n=16$, *S. simplex* (Willd.) Á. Löve & D. Löve $2n=32$ (Love & Love, 1982), *S. expansum* (Poepp. ex Spreng.) G.L. Nesom ($2n=10$, Carr *et al.*, 1999), *S. patens* (Aiton) G.L. Nesom ($2n=10, 20$, Nesom, 2006). Como observado, há grande variação cromossômica no gênero, onde o menor valor é $2n=10$ e o maior $2n=64$.

Em *Conyza sumatrensis* var. *leotheca*, nossa contagem ($2n=ca.54$) confirma o resultado publicado por Urdampilleta (2005). Além dessa variedade, existe registro para mais duas variedades de *C. sumatrensis*: *C. sumatrensis* var. *sumatrensis* e *C. sumatrensis* var. *floribunda* (Kunth) J.B. Marshall (Urdampilleta 2005), todas apresentando o mesmo número cromossômico, $2n=54$. Nesse sentido o número é estável nessa espécie e importante para separar citogeneticamente de outras espécies, tendo em vista que outras espécies de *Conyza* possuem números cromossômicos diferentes, como por exemplo, *C. aegyptiaca* (L.) Aiton ($2n=18$, Sarkar *et al.*, 1982), *C. primulifolia* (Lam.) Cuatrec. & Lourteig ($2n=72$, Urdampilleta 2005) e *C. pannosa* Webb ($2n=36$, Brochmann *et al.*, 1997).

O número básico da tribo Astereae é $x=9$, mas menores valores, como $x=4, 5, 6, 7$ e 8 , são encontrados. Para Xiaoping & Bremer (1992) os valores menores de número básico foram reduzidos a partir do valor primitivo, $x=9$.

Tribo Cichorieae

A tribo Cichorieae, também conhecida como Lactuceae Cass. (1819), é a tribo mais investigada taxonomicamente (Kilian *et al.*, 2009). Os números cromossômicos para tribo possuem uma ampla diversidade, variando de $2n=8$, em *Dianthoseris schimperi* (Hedberg & Hedberg, 1977) a $2n=188$ em *Sonchus uliginosus* (Tomb *et al.*, 1978). Em relação ao número básico para a tribo também existe uma ampla variação, sendo $x=9$ o mais frequente (Kilian *et al.* 2009). Eventos de aneuploidia são sugeridos por Turner *et al.*

(1961) para explicar a redução do número básico $x=9$ da tribo até $x=3$, bem como eventos de dispoloidia seguidos de autopoliploidia poderiam explicar o surgimento de números básicos mais altos, como em *Warionia saharae* Benthem ex Coss., com $x=17$ (Humphries *et al.*, 1978; Kilian *et al.*, 2009).

As contagens cromossômicas para as três espécies estudadas (Tabela 02) confirmam dados anteriores, com $2n=16$ em *Youngia japonica* (Nishikawa, 1984), $2n=32$ em *Sonchus oleraceus* (Arohonka, 1982) e $2n=26$ em *Taraxacum officinale* (Kliphuis & Wieffering, 1979). Entretanto, em *T. officinale* também são encontrados diferentes números cromossômicos na literatura, como $2n=24$, 26-27, 32, 40, 44, 48 (Gill, 1969) e $2n=22$ (Belaeva & Siplivinsky, 1975). As diferentes contagens em *T. officinale* podem estar associadas à ocorrência de citótipos na espécie, ou a erros de contagens, ou de identificação botânica dos materiais estudados.

Existe aparente variação de número cromossômico em Crepidinae, com $2n=16$ em *Y. japonica* e $2n=26$ e as variações relatadas por Gill (1969) e Belaeva & Siplivinsky (1975) em *T. officinale*.

Outro gênero da subtribo Crepidinae mencionado na literatura é *Crepis*. Para as espécies do velho mundo, Babcock *et al.* (1942) sugeriram que, a partir de eventos de dispoloidia, o gênero evoluiu para uma redução do número cromossômico, e por conseguinte para valores menores de x , como $x=6$, 5, 4 e 3. No estudo com dez espécies do gênero: *C. viscidula* ($2n=12$), *C. paludosa* ($2n=12$), *C. conyzaeifolia* ($2n=12$), *C. bithynica* ($2n=c. 40$), *C. schachtii* ($2n=10$), *C. pulchra* ($2n=8$), *C. sancta* ($2n=10$), *C. setosa* ($2n=8$), *C. zacintha* ($2n=6$) e *C. biennis* ($2n=c. 40$), Dimitrova & Greilhuber (2000) chegaram a resultados que corroboraram a proposta de Babcock *et al.* (1942).

Tribo Coreopsideae

Para os grupos basais (*Ericentrodea* e *Hidalgoa*) da tribo Coreopsideae o número básico sugerido é $x=16$ e para os demais taxa o número básico apontado é $x=12$ (Daniel, *et al.*, 2009). O número básico (x) do gênero *Bidens* é 12. Desse modo, seriam múltiplos de x valores como $2n=36$ ($3x$); $2n=48$ ($4x$); $2n=60$ ($5x$) e $2n=72$ ($6x$), já relatados por Nirmala & Rao (1986) e (Sharma, 1970) para espécies de *Bidens*.

Para as duas espécies de *Bidens* estudadas, *B. pilosa* e *B. subalternans*, o número cromossômico encontrado foi $2n=72$. Nossa contagem para *B. subalternans* DC. divergiu em relação ao relato de $2n=48$ feito por Renard *et al.* (1983) e Grombone-Guaratini *et al.* (2006). Contudo, todas as contagens para *B. subalternans* são múltiplos de 12, sugerindo se tratar de citótipos diferenciados pelo nível de ploidia ($2n=6x=72$ e $2n=4x=48$).

Em estudos com *B. pilosa*, além de $2n=72$ relatado em nosso estudo e por Banerjee (1971) e Grombone-Guaratini *et al.* (2006), já foram encontradas outras contagens, como $2n=70$ (Mariano & Marin-Morales, 1999) e $n=35 +B$ (Jansen *et al.*, 1984). Fachinetto *et al.* (2008) estudaram seis populações do Rio Grande do Sul, encontrando três números cromossômicos diferentes ($2n=36$, 48 e 54). Para os autores, essa variação numérica representa citótipos, e estes por sua vez, foram definidos como poliploides e aneuploides, a partir da observação de células em meiose. Embora o processo meiótico tenha sido definido como regular pelos autores, foram observados algumas irregularidades no pareamento dos cromossomos pela presença de cromossomos univalentes, trivalentes e tretavalentes.

Tribo Mutisieae

A tribo Mutisieae *sensu* Panero não possui sinapomorfias em nível morfológico, mas seus representantes compartilham algumas características comuns como corola bilabiada, lábio externo trilobado e lábio interno com segmentos livres; e papus com cerdas. Os gêneros mais diversos são *Chaptalia*, *Mutisia*, *Chaetanthera*. e *Trichocline* (Judd, W. S. *et al.* 2009). O número cromossômico determinado em nosso estudo para duas espécies de *Chaptalia*, *C. interegima* $2n=$ ca. 48 e *C. nutans* $2n=$ ca. 50, confirmou publicações anteriores (Coleman, 1968; Teppner & Tropper. 1984, Fregonezzi *et al.*, 2004). A variabilidade cromossômica dentro do mesmo gênero não é algo exclusivo de *Chaptalia*, e também está presente em outros gêneros da tribo como *Mutisia* (Hunziker *et al.*, 1989; Carr *et al.*, 1999) e *Chaetanthera* (Grau, J. 1987). A diferenciação de dois ou de poucos cromossomos entre espécies relacionadas pode ser decorrente de eventos de aneuploidia.

Demais tribos: Gnaphalieae, Gochnatieae, Helenieae, Inuleae, Nassauvieae, Neuroleneae, Senecioneae e Tageteae

Nosso dado é inédito para a espécie *Gochnatia barrosii* ($2n=44$). Citogeneticamente, esse gênero é pouco estudado, sendo encontrado apenas um registro para a espécie *G. vernonioides* Kunth, para a qual Carr *et al.* (1999) encontraram $n=23$ II ($2n=46$). Nossos dados confirmaram publicações anteriores para *Achyrocline satureioides* $2n=28$ ($n=14$) e *Erechtites valerianifolius* $2n=40$ ($n=20$, Jansen *et al.*, 1984), *Porophyllum ruderale* $2n=44$ (Molero *et al.*, 2002), *Trixis antimenorrhoea* $2n=54$ ($n=27$, Powell *et al.* 1974), *Calea pinnatifida* $2n=38$ ($n=19$), *Pterocaulon alopecuroides* $2n=20$ ($n=10$, Coleman, J. R. 1968), além de *Tagetes minuta* $2n=48$ (Renard *et al.*, 1983).

Para o gênero *Achyrocline* há registro de contagem cromossômica para mais duas espécies, *A. alata* (Kunth) DC e *A. trianae* Klatt, ambas com $n=14$ II ($2n=28$) (Carr *et al.*, 1999). Para o gênero *Erechtites* há apenas mais um registro para a espécie *E. hieraciifolius* (L.) Raf. ex DC. com $2n=40$ (Murin, 1976; Parfitt, 1981; Arano, H. 1975). Tais registros indicam que esses dois gêneros possuem estabilidade cromossômica.

Estudos citogenéticos em *Porophyllum* já determinaram o número cromossômico para 12 espécies: $n=11$ em *P. viridiflorum* (Kunth) DC. (Strother, & Panero, 2001); $n=12$ em *P. calcicola* B.L. Rob. & Greenm., *P. linaria* (Cav.) DC., *P. coloratum* (Kunth) DC., *P. nelsonii* B.L. Rob. & Greenm., *P. punctatum* (Mill.) S.F. Blake, *P. scoparium* A. Gray e *P. zimapanum* B.L. Turner (Ralston *et al.*, 1989; Keil, & Stuessy. 1975; Strother, 1983a,b; Zhao & Turner. 1993); $n=15$ em *P. tridentatum* Benth. (Reveal, & Moran, 1977); $n=22$ em *P. lanceolatum* DC e *P. ruderale* (Jacq.) Cass. (Hunziker *et al.*, 1989; Powell *et al.*, 1975); e $n=24$ em *P. gracile* Benth. (Zhao, 1996).

As contagens cromossômicas revelaram com isso diversidade interespecífica e intragérica, onde o número cromossômico mais frequente é $n=12$ ($2n=24$). Essa variabilidade nos valores de n (11, 12, 15, 22 e 24) pode estar associada a eventos de disploidia, aneuploidia e ploiploidia, uma vez que existem valores intermediários (11, 12 e 15) e valores duplicados como $n=22$ e 24.

O número cromossômico $2n=54$ já foi relatado para outras espécies do gênero *Trixis*, a citar *T. californica* ($n=27$) (Ward, 1983) e *T. grisebachii* ($n=27$) (Waisman *et al.*, 1984). Para *T. inula* foram relatados dois valores, $n=27$ (Sundberg *et al.* 1986) e 28 II (Carr

et al., 1999). Mesmo assim, $2n=54$ pode ser considerado um número estável para o gênero. Do mesmo modo, $2n=20$ é comum para as espécies de *Pterocaulon*, como relatado em *P. sphacelatum* ($n=10$, Watanabe *et al.*, 1999) e *P. virgatum* ($n=10$, Waisman *et al.* 1984).

CONCLUSÕES

- O levantamento de dez novas espécies de Asteraceae para Serra do Japi representa um incremento à lista de compostas já registradas bem como ratifica a importância dessa família para a área em termos de riqueza de espécies.
- No universo de 35 espécies que tiveram seus números cromossômicos determinados, seis novas contagens foram apresentadas, e quatro divergiram de relatos anteriores.
- A ampla variação cromossômica encontrada ($2n=18$ a 72) nesse estudo confirma dados da literatura quanto à alta variabilidade cromossômica na família Asteraceae.
- Foi detectada a presença de citótipos em espécies pertencentes a duas tribos: Eupatorieae (*Praxelis kleineoides*) e Coreopsideae (*Bidens subalternans*).
- O tamanho cromossômico variou de $0,62\ \mu\text{m}$ em *Heterocondylus vitalbae* a $3,5\ \mu\text{m}$ em *Chaptalia nutans*.
- Os ideogramas elaborados para as espécies dos gêneros *Baccharis*, *Chromolaena*, *Grazielia*, *Symphyotrichum*, *Pterocaulon*, *Trichogoniopsis* e *Vernonia* são inéditos. Foram encontrados dois tipos cromossômicos, metacêntrico e submetacêntrico, e o índice de simetria (TF%) revelou que os cariótipos são moderadamente simétricos.
- Dentre as 14 tribos amostradas, o número básico (x) variou de $x=8$ a $x=17$, sendo que o número básico predominante foi $x=10$ (34,2%). Este foi encontrado em cinco

tribos: Asteraceae, Eupatorieae, Inuleae, Senecioneae e Vernonieae. Em relação aos gêneros, em *Vernonia*, o gênero mais bem representado, o valor de x mais frequente foi x=17 e em *Baccharis*, o segundo gênero mais representado, o número básico encontrado foi x=9.

- A ampla variação cromossômica em Asteraceae, comprovada nesse estudo, não pode ser explicada apenas por um único evento, mas por uma combinação de poliploidia, disploidia e aneuploidia, como já indicado para as tribos Vernonieae e Cichorieae em estudos anteriores.

REFERÊNCIAS

- Ab'Saber, A. N. 1992. **Serra do Japi, sua origem geomorfológica e a teoria dos refúgios**. In: MORELLATO, L. P. C. (org.) História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas-SP. Editora da Unicamp/FAPESP.
- Arano, H. 1975. Cytogenetic studies in subfamily Carduoideae of Japanese Compositae XXVIII. The karyotypes and speciation in the Japanese Senecioneae. **J. Saitama Univ. Fac. Educ.** **24**: 15–29. 38.
- Arohonka, T. 1982. Chromosome counts of vascular plants of the island Seili in Nauvo, southwestern Finland. Turun Yliopiston Julkaisuja, Sar. A 2, **Biol.-Geogr.** **3**: 1–12.
- Banerjee, A. K. 1971. Cytological investigations on some Indian members of the tribe Helianthoideae (Family – Compositae). **J. Cytol. Genet.** **6**: 90–109.
- Belaeva, V. A. & Siplivinsky, V. N. 1975. Chromosome numbers and taxonomy of some species of Baikal flora. **Bot. Zhurn. (Moscow & Leningrad)** **60**(6): 864–872.

- Babcock E. B.; Stebbins G. L.; Jenkins J. A. 1942. Genetic evolutionary processes in *Crepis*. **American Naturalist** **76**: 337–363.
- Bohlmann, F. & Jakupovic, J. 1990. Progress in the chemistry of the Vernonieae (Compositae). **Plant Systematics and Evolution, Supplementum** **4**: 3–43.
- Borkosky, S.; Vales, D.A.; Bardon, A.; Diaz, J.G. & Herz, W. 1996. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eirmocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta*. **Phytochemistry** **42**: 1637–1639
- Bremer, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland, Oregon: TIMBER PRESS.
- Bremer, K. 1996. Major clades and grades of the Asteraceae. In: Hind, D. J. N., Beentje, H. J. (Eds) **Compositae: Systematics. Proceedings of the Internacional Compositae Conference**. Vol. 1. Richmond, Kew Royal Botanic Gardens.
- Carr, G. D.; King, R. M.; Powell, A. M. & Robinson, H. 1999. Chromosome numbers in Compositae. XVIII. **Amer. J. Bot.** **86**(7): 1003–1013.
- Chambers, K. L., D. Green, S. Potampa & L. McMahan. 1998. IOPB chromosome data 13. Newslett. **Int. Organ. Pl. Biosyst. (Oslo)** **29**: 18–22.
- Chatterjee, T & Stiarma, A. K. 1969. Cytotaxonomy of Cichorieae. **Genetica** **40**:577-590.
- Coleman, J. R. 1968. Chromosome numbers in some brazilian compositae. **Rhodora**. **10**, 782.
- Corrêa, A. M. & Forni-Martins, E. R. 2004. Chromosomal studies of Rubiaceae (A. L. de Jussieu) from the Brazilian cerrado. **Caryologia** vol. **57**, n° 3:250-258.

- Corrêa, A. M. 2007. **Citotaxonomia de representantes da subfamília Rubioideae (Rubiaceae) nos cerrados do estado de São Paulo**. Tese de doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- Daniel, J *et al.* **Coreopsideae**. In: Funk, V. A.; Susanna, A. Stuessy, T. F. Bayer, R. J. eds. Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, 171-189.
- Dematteis, M. 2002. Cytotaxonomic analysis of South American species of *Vernonia* (Vernonieae: Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **139**, 401–408.
- Fregonezi, J. N.; Torezan, J. M. D & Vanzela, A. L. L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence in situ hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA3 banding. **Genetics and Molecular Biology**, **27**, 2, 223-227.
- Funk, V. A.; Susanna, A.; Stuessy, T. F.; Robinson, H. 2009. **Classification of Compositae**. In: Funk, V. A.; Susanna, A. Stuessy, T. F. Bayer, R. J. eds. Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, 171-189.
- Gill, L. S. 1969. A note on the cytomorphology of *Taraxacum officinale* complex from NW Himalayas. **Bull. Bot. Surv. India** **11**: 205–206.
- Grau, J. 1987. Chromosomenzahlen chilenischer Mutisieen (Compositae). **Bot. Jahrb. Syst.** **108**(2/3): 229–237.
- Grombone-Guaratini. 2006. Chromosomal studies of three species of *Bidens* (L.) (Asteraceae). **Caryologia** **59**(1): 14–18.
- Guerra, M. 1983. O uso de Giemsa em citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandamento. **Ciência e Cultura**, **35**: 190-193.

- Guerra, M. 1988. **Introdução à citologia geral**. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara.
- Guerra, M & Nogueira, M. T. 1990. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (*Asteraceae: Senecioneae*) occurring in Brazil. **P1. Syst. Evol.** **170**, 229-236
- Guerra, M. & Souza, M. J. 2002. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto-SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.
- Hedberg, I. & Hedberg, O, 1977. Chromosome numbers of afroalpine and afromontane angiosperms. **Bot. Not.** **130**: 1–24.
- Heiden, G.; Iganci, J. R. V.; Stein, V.; Bobrowski, V., L. 2006. Número cromossômico de *Baccharis riograndensis* MALAG. & J. E. VIDAL (*asteraceae*). **PESQUISAS, BOTÂNICA N° 57**: 121-136. São Leopoldo, Instituto Anchietano de Pesquisas.
- Humphries, C. J. ; Murray, B. G.; Bocquet, G. & Vasudevan, K. N. 1978. Chromosome numbers of phanerogams from Morocco and Algeria. **Bot. Not.** **131**: 391–404.
- Hunziker, J. H.; Wulff, A.; Xifreda, C. C. & Escobar, A. 1989. Estudios cariológicos en Compositae V. **Darwiniana** **29**: 25–39.
- Huziwara, Y. 1956. Karyotype analysis in some genera of compositae –I. Karyotype of Japanese *Eupatorium*. **Cytologia** **21**: 114-123.
- Huziwara, Y. 1957. Karyotype Analysis in Some Genera of Compositae. III. The karyotype of the *Aster ageratoides* Group. **American Journal of Botany**, **44**, N° 9, 783-790.

- Ito, M. *et al.* 2000. Phylogeny and phytogeography of Eupatorium (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. **Journal of Plant Research** **113**: 79-89.
- Jansen, R. K.; Stuessy, T. F.; Díaz-Piedrahíta, S. & Funk, V. A. 1984. Recuentos cromosómicos en Compositae de Colombia. **Caldasia** **14**(66): 7–20.
- Jones, S. B. 1979. Chromosomes of Vernoniae (Compositae). **Bull. Torrey Bot. Club** **106**: 79–84.
- Jones, S. B. 1982. In: IOPB chromosome number reports LXXIV. **Taxon** **31**: 126–127.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. **Plant Systematics – a phylogenetic approach**. Massachusetts, Sinauer Associates. 465p.
- Judd, W. S. *et al.* 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmede, 3ed., 632p.
- Keeley, S. C., Forsman, A. H. & Chan, R. 2007. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (*trnL-F*, *ndhF*, ITS). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **44**: 89–103.
- Keeley, S. & Robinson, H. 2009. **Vernonieae**. In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Funk, V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.
- Keil, D. J. & Stuessy, T. F. 1975. Chromosome counts of Compositae from the United States, Mexico and Guatemala. **Rhodora** **77**: 171–195.

- Keil, D. J., Luckow, M. A. & Pinkava D. J. 1988. Chromosome studies in Asteraceae from the United States, Mexico, the West Indies, and South America. **Amer. J. Bot.** **75**: 652–668.
- Kilian, N.; Gemeinholzer, B.; Lack, H. W. 2009. **Cichorieae**. *In*: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Funk. V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.
- King, R. M.; Janaske, P. C. & Lellinger, D. B. 1995 a. Cassini on Compositae II. **Monographs in Systmatic Botany from Missouri Botanical Gardens 54.**
- King, R. M.; Janaske, P. C. & Lellinger, D. B. 1995 b. Cassini on Compositae III. **Monographs in Systmatic Botany from Missouri Botanical Gardens 54.**
- King, R. M. & Robinson, H. 1987. **The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 22. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Kliphuis, E. & Wieffering, J. H. 1979. In IOPB chromosome number reports LXIV. **Taxon** **28**:398–400.
- Lombardi, J. A *et al.* 2012. Vascular flora of Serra do Japi Biological Reserve, Jundiá, southeastern Brasil. **Rodriguésia** **63** (2): 333-340.
- Morton, J. K. 1993. Chromosome numbers and polyploidy in the flora of Cameroon Mountain. **Opera Bot.** **121**: 159–172.
- Mansanares, M. E. 2004. **Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae)**. Tese de doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

- Mariano, A. C. & Marin-Morales, M. A. 1999. Chromosome polymorphism and cytotype establishment in *Bidens pilosa* (Asteraceae). **Cytobios** **97**: 45–60.
- Molero, J.; Rovira, A.; Simón, J.; Duré, R. & Franco, D. 2002. IOPB chromosome data 18. Newslett. Int. Organ. Pl. Biosyst. (**Pruhonce**) **34**: 22–24.
- Monge, M. & Semir, J. 2012. **A família Asteraceae na Serra do Japi**. In: Vasconcellos-Neto, J. *et al.* (Organizadores). *Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade*. Curitiba – PR, CRV, 1ed., 628p.
- Murin, A. 1976. In: Index of chromosome numbers of Slovan flora. Part 4. Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comenianae, **Bot.** **25**: 1–18.
- Nirmala, A. & Rao, P. N. 1986. Karyotype studies in some Asteraceae. **Kromosomo** **42**: 1311–1315.
- Nishikawa, T. 1984. Chromosome counts of flowering plants of Hokkaido (7). **J. Hokkaido Univ. Educ., Sect. 2B** **35**: 31–42.
- Oliveira, V. M.; Forni-Martins, E. R. & Semir, J. 2007a. Cytotaxonomy of species of *Vernonia*, section *Lepidaploa*, group *Axilliflorae* (Asteraceae, Vernonieae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, **154**, 99–108.
- Oliveira, V. M.; Forni-Martins, E. R. & Semir, J. 2007b. Cytotaxonomic studies in six species of *Vernonia* (Asteraceae: Vernonieae). **CARYOLOGIA**, vol. **60**, n° 1: 37–47.
- Oliveira, V. M.; Semir, J. & Forni-Martins, E. R. 2012. Chromosome Numbers and Karyotypes of Species of *Vernonia* sect. *Lepidaploa* (Asteraceae: Vernonieae) **Folia Geobot** **47**: 93–103.

- Oliveira, V. M.; Mansanares, M. E.; Semir, J. and Forni-Martins, E. R. 2012. Karyotype characterization of two populations of *Vernonia geminata* (Asteraceae, Vernonieae) using banding and FISH techniques. **Genetics and Molecular Research**. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.25.1>.
- Panero, J. L. & Funk, V. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington** **115**(4): 909-922.
- Parfitt, B. D. 1981. In Chromosome number reports LXXI. **Taxon** **30**: 515–516.
- Peng, C. i. & Hsu, C. c. 1977. In IOPB chromosome number reports LVIII. **Taxon** **26**: 557–565.
- Pinto, H. S. 1992. **Clima da Serra do Japi**. In: MORELLATO, L. P. C. (org.) História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas-SP. Editora da Unicamp/FAPESP.
- Powell, A. M.; Kyhos, D. W.; Raven, P. H.. 1974. Chromosome numbers in compositae x. **Amer. J. Bot** **61**(8): 909-913.
- Powell, A. M., Kyhos, D. W. & Raven, P. H. 1975. Chromosome numbers in Compositee. XI. Helenieae. **Amer. J. Bot.** **62**: 1100–1103.
- Ralston, B. G. Nesom, G. & Turner, B. L. 1989. Documented plant chromosome numbers 1989: 1. Chromosome numbers in Mexican Asteraceae with special reference to the tribe Tageteae. **Sida** **13**: 359–368.
- Renard, R., J. *et al.* 1983. Nombres chromosomiques de quelques Angiospermes du Rwanda, du Burundi et du Kenya. **Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.** **53**: 342–371.

- Reveal, J. L. & Moran, R. 1977. Miscellaneous chromosome counts of western American plants—IV. **Madroño** **24**: 227–235.
- Robinson, H.; Powell, A. M; Carr, G. D.; King, R. M & Weedin, J. F. 1989. Chromosome numbers in Compositae, XVI: Eupatorieae II. **Ann. Missouri Bot. Gard.** **76**: 1004–1011.
- Robinson, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contr Bot** **9**:1–116
- Robinson, H. Schilling, E. & Panero, J. L. 2009. **Eupatorieae**. In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. FUNK. V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.
- Ruas, C. F. & Aguiar-Perecin, M. L. R. 1997. Chromosome evolution in the genus *Mikania* (Compositae). **American Journal of Botany** **84**(9): 1156-1163.
- Sarkar, A. K.; Chatterjee, U. & Sinha, A. 1981. Cytology of two species of Compositae to assess their affinities and taxonomic relationship. **Cell Chromosome Newslett.** **4**: 9–10.
- Sarria-Perea, J. A. & Duarte J. M. B. 2009. **Comparação entre alguns citótipos de Mazama americana (Artiodactyla; Cervidae): quanto grande é a diferença entre eles?** In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort , Águas de Lindóia, SP , Brasil, p.173.
- Semple, J. C. & Watanabe. K. 2009. **A review of chromosome numbers in Asteraceae with hypotheses on chromosomal base number evolution**. In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. FUNK. V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.

- Sharma, A. K. 1970. Annual report, 1967-1968. Res. Bull. Univ. **Calcutta Cytogenetics Lab. 2**: 1–50.
- Simpson, B. B. 2009. **Economic importance of Compositae**. In: Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Funk. V. A. *et al.* (Eds.), Vienna, Austria: Internacional Association for Plant Taxonomy, Universidade of Vienna.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2005. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa,SP: Instituto Plantarum.
- Strother, J. L. 1976a. Chromosome studies in Compositae. **Amer. J. Bot.** **63**: 247–250.
- Strother, J. L. 1983b. More chromosome studies in Compositae. **Amer. J. Bot.** **70**(8): 1217–1232.
- Strother, J. L. & Panero, J. L. 2001. Chromosome studies: Mexican Compositae. **Amer. J. Bot.** **88**(3): 499–502.
- Sundberg, S.; Cowan, C. P. & Turner, B. L. 1986. Chromosome Counts of Latin American Compositae. **Amer. J. Bot.** **73**(1): 33–38.
- Teppner, H. & Tropper, S. 1984. Chromosomen und chromatin-typen bei *Chaptalia nutans* (Asteraceae-Mutisieae). Kurzfassungen (der Beitr;auage). **Botaniker-Tagung, Deutscher Botanische Gesellschaft Wien, September 1984**: 8.
- Tomb, A. S., *et al.* 1978. Chromosome numbers in the Compositae XIV. Lactuceae. **Amer. J. Bot.** **65**: 717–721.
- Turner, B. L.; Ellis, W. L. King, R. M. 1961. Chromosome numbers in the Compositae 4. **American Journal of Botany** **48**:216-223.

- Urdampilleta, J. D. 2005. Karyotypic studies and morphological analysis of some reproductive features in five species of *Conyza* (Astereae: Asteraceae) from northeastern Argentina. **Bol. Soc. Argent. Bot.** **40**(1–2): 91–99.
- Vasconcellos-Neto, J. *et al.* (Organizadores). 2012. **Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade**. Curitiba – PR, CRV, 1ed., 628p.
- Xiaoping, Z & Bremer, K. 1992. A cladistic analysis of the tribe *Astereae* (*Asteraceae*) with notes on their evolution and subtribal classification. **Pl. Syst. Evol.** **184**:259–283.
- Xie, Z. Y. & Zheng, C. M. 2003. Cytological studies on 13 species of Compositae from Hainan, China. **Acta Phytotax. Sin.** **41**(6): 545–552.
- Ward, D. E. 1983. Chromosome counts from New Mexico and southern Colorado. **Phytologia** **54**: 302–309.
- Waisman, C. E.; Rozenblum, E. & Hunziker, J. H. 1984. Estudios cariológicos en Compositae I. **Darwiniana** **25**: 217–226.
- Watanabe, K. *et al.* 1995. Chromosomal cytology and evolution in Eupatorieae (Asteraceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden** **82**: 581–592.
- Watanabe, K., *et al.* 1999. Asteraceae: chromosome numbers and karyotypes in the Australian Gnaphalieae and Plucheeae. **Austral. Syst. Bot.** **12**: 781–802.
- Zhang, M. J. He, X. L. 2010. Chromosome numbers and karyotype of five species from Seriphidium (Asteraceae). **Plant Syst Evol** **290**:109–113.

Zhao, Z. 1996. Documented chromosome numbers 1996:2. Miscellaneous U. S. A. and Mexican species, mostly Asteraceae. *Sida* 17(1): 259–263.

Zhao, Z. & Turner, B. L. 1993. Documented chromosome numbers 1993: 3. Miscellaneous U.S.A. and Mexican species, mostly Asteraceae. ***Sida* 15**: 649–653.

CAPÍTULO 2

“Bandamento CMA+/DAPI- e FISH em espécies de Asteraceae da Serra do Japi-SP”.

RESUMO

A família Asteraceae (Compositae) possui distribuição cosmopolita e reúne uma grande riqueza de espécies, com cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros. No Brasil há uma estimativa de 300 gêneros e 2.000 espécies. A análise cariotípica é fundamental para a caracterização citogenética de uma espécie, bem como para examinar a variação entre seus indivíduos e populações. O presente estudo objetivou ampliar o conhecimento cariotípico de espécies de Asteraceae aplicando as técnicas de bandamento CMA/DAPI e de FISH (sequências de rDNA5S e 45S). As 16 espécies foram coletadas na Serra do Japi, uma importante feição geomorfológica situada a oeste do Planalto Atlântico no estado de São Paulo e que apresenta uma grande riqueza de espécies de Asteraceae. Foram observadas bandas CMA⁺/DAPI⁺, com variações no número (2 a 12) e posição (terminal ou intersticial). A distribuição de sítios de DNAr 45S e 5S foi observada em cinco espécies, *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* (2n= ca.54), *Bidens pilosa* (2n=72), *Mikania* sp (2n=34), *Vernonia diffusa* (2n=34) e *V. remotiflora*. (2n=28). Houve variação de 2 a 6 sítios de DNAr 45S e de 2 a 3 sítios de DNAr 5S. Os sítios de DNAr 5S e de DNAr 45S se posicionaram no mesmo cromossomo (*V. remotiflora*) ou em cromossomos distintos (demais espécies). A presença de apenas um par de sítios de DNAr 5S é comum para Asteraceae. Nossos dados de bandamento CMA/DAPI e FISH são inéditos para todas as espécies estudadas.

Palavras-chave: Asteraceae, cromossomos, bandas CMA⁺/DAPI⁺, técnica de FISH Serra do Japi.

ABSTRACT

The Asteraceae family (Compositae) presents cosmopolitan distribution and gathers a large richness of species, with around 23.000 species and 1.600 genera. In Brazil the composites are well representatives, with about 300 genera and 2.000 species. The analysis of karyotype is important to the cytogenetic characterization of any species, as well to examine the variation between its individuals and populations. The present study aimed to enlarge the karyotype knowledge of Asteraceae species applying CMA/DAPI banding and FISH techniques (sequences of 5S and 45S rDNA). The 16 species were collected in the Japi mountain range, an important geomorphological feature located west of the Atlantic Plateau in state of São Paulo, characterized by a large number of species of Asteraceae. We observed CMA⁺/DAPI bands, with variations in number (2 to 12) and position (terminal or interstitial). The distribution of 5S and 45S rDNA was observed in five species, *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* (2n= ca.54), *Bidens pilosa* (2n=72), *Mikania* sp (2n=34), *Vernonia diffusa* (2n=34) e *V. remotiflora*. (2n=28). There was variation of 2 to 6 sites of 45S rDNA and of 2 to 3 sites of 5S rDNA. The sites of 45S rDNA and 5S rDNA were positionated in the same chromosome (*V. remotiflora*) or in distincts chromosomes (others species). The presence of only one pair of sites of DNAr 5S is common to Asteraceae. Our data of banding CMA/DAPI and FISH are original for all studied species.

Key-words: Asteraceae, chromosomes, CMA⁺/DAPI bands, FISH technique, Japi mountain range.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae (Compositae) possui distribuição cosmopolita e reúne uma grande riqueza de espécies, com cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros. No Brasil as compostas são bem representativas, estimando-se que ocorram cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies. Podem ser encontradas principalmente nos campos abertos, mas algumas espécies ocorrem no interior de florestas (Souza & Lorenzi, 2005). Um importante ambiente, no qual já foi registrada uma grande diversidade de compostas, é a Serra do Japi. A Serra do Japi é uma feição geomorfológica situada a oeste do Planalto Atlântico nas proximidades de Jundiaí e Cabreúva, no estado de São Paulo. Abriga uma das últimas grandes áreas de floresta contínua do Estado de São Paulo, abrangendo 354 km² (Vasconcellos-Neto *et al.*, 2012). Recente levantamento florístico, especificamente em Asteraceae, foram amostradas 90 espécies na Serra do Japi (Monge & Semir, 2012).

Desde o primeiro sistema de classificação proposto para Asteraceae por Cassini (King *et al.*, 1995 a,b), vários autores propuseram novos arranjos para a família. Finalmente, Funk *et al.* (2009), usando árvores filogenéticas para a família como um todo, e para clados individuais, publicadas ou não, construíram o que autores definiram como “metatree”, uma espécie de árvore de árvores, a partir da qual dividiram a família em 12 subfamílias e 43 tribos.

A análise cariotípica é fundamental para a caracterização citogenética de uma espécie, bem como para examinar a variação entre seus indivíduos e populações. A comparação de cariótipos entre espécies, por sua vez, pode permitir a análise de um dado táxon, como por exemplo, um gênero, uma tribo, etc (Guerra, 1988).

Através da aplicação de técnicas de diferenciação longitudinal dos cromossomos, podemos observar marcas nos cromossomos, como bandas (caracterizando a heterocromatina, inclusive com a composição preferencial de bases), bem como sítios (segmentos de DNA previamente identificados), os quais fornecem um maior nível de detalhamento dos cromossomos e, conseqüentemente, mais um padrão de diferenciação citogenética (Guerra & Souza, 2002; Guerra, 2012).

Quando atentamos para a riqueza da família Asteraceae, são escassos os trabalhos onde foram aplicadas essas técnicas. Baeza & Schrader (2004), fazendo uso da técnica de hibridização de DNA *in situ* (FISH) e utilizando genes de DNA ribossomais (DNAr), analisaram a presença/distribuição de *loci* ribossomais 18/25S e 5S nos gêneros *Haplopappus* Cass. e *Grindelia* Willd. A distribuição (número e posição de DNAr) mostrou que, para evolução dos gêneros supracitados para o Novo Mundo, não foram necessárias grandes mudanças cariotípicas, mas pequenos rearranjos cromossômicos, em especial, em relação aos sítios de DNAr 5S.

Outro trabalho interessante foi realizado por Garcia *et al.* (2007) com seis espécies de *Artemisia*, com ênfase no subgênero *Tridentatae*. Nesse estudo, foi utilizado bandamento CMA/DAPI e técnica de FISH com uso de sondas de DNAr. Foi observado que todos os sítios de DNAr (45S e 5S) se apresentavam co-localizados com bandas CMA+. Esse dado já havia sido observado em outras famílias de angiospermas, mas em Asteraceae, até o momento, era inédito. Os autores sugeriram que para a evolução de *Artemisia* não foram necessárias grandes mudanças cromossômicas, apenas alguns rearranjos cromossômicos.

Mazella *et al.* (2010) evidenciaram uma grande semelhança entre espécies/populações de *Achyrocline*. A análise do número cromossômico, distribuição dos sítios ribossomais 45S e 5S e conteúdo de DNA nuclear sugeriram uma diferenciação evolutiva recente no gênero. Todas as espécies apresentaram $2n=28$ e cariótipos simétricos, com predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, e quantidade de DNA semelhante, com valores de $2C$ variando de 5,73-6,03 pg. A respeito da FISH, três espécies (*A. flaccida*, *A. satyroides* e *A. alata*) apresentaram sítios de 45S em regiões pericentroméricas. Tais dados evidenciaram uma grande semelhança entre as espécies/populações, e com isso, sugeriram que houve uma diferenciação evolutiva recente.

Numa pesquisa desenvolvida com dez espécies de *Helianthus* obtidos do banco de germoplasma da Embrapa de Londrina-PR (Brasil), Vanzela *et al.* (2002) fizeram uso de várias técnicas para caracterização citogenética desse gênero, a saber, coloração de Feulgen, coloração de Giemsa, bandamento C e CMA₃ (C-CMA), e técnica de FISH com sondas de DNAr 45S. Os números cromossômicos de todas as espécies foram múltiplos de $x=17$. Houve um predomínio de bandas C-CMA terminais e sítios de DNAr 45S. De modo

geral, foram encontradas diferenças quanto ao número, tamanho e morfologia dos cromossômicos, sugerindo com isso que poucos rearranjos implicaram na evolução cariotípica do gênero.

O presente estudo teve por objetivo ampliar o conhecimento cariotípico de espécies de Asteraceae ocorrentes na Serra do Japi. Essas espécies tiveram seus números cromossômicos previamente determinados por Braga (2014, ver Capítulo 1). Foram aplicadas as técnicas de bandamento CMA/DAPI e de FISH (para as sequências de sítios de DNAr 5S e 45S) para caracterização cariotípica das espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

As 16 espécies foram coletadas na Serra do Japi (Tabela 01), na porção referente à Reserva Biológica Municipal (RBM) da Serra do Japi. Foram herborizados ramos florais e vegetativos das espécies coletadas, seguindo técnicas usuais. O material testemunho foi depositado no Herbário UEC (Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas). A identificação das espécies foi feita pelo M.Sc. Marcelo Monge Egea e Prof Dr João Semir, especialistas em Asteraceae.

Pré-tratamento e preparação de lâminas com digestão enzimática

As raízes recém-emergidas de cipselas germinadas foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com 8-hidroxiquinoleína (8Hq – solução 0,002M), por 24h a 4°C. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução Farmer (etanol: ácido acético; 3:1) por 24h em temperatura ambiente (TA), e depois transferidas para o freezer.

Para a preparação de lâminas com enzima, as raízes foram lavadas 3x em água destilada por 5min cada e enxutas em papel filtro. As pontas das raízes foram digeridas em solução enzimática com 2% de celulase, 20% de pectinase e 1% de macerosima em câmara úmida, a 37°C por 10 a 20 min. Em seguida as raízes foram lavadas em água destilada (2x por 5min). Após o esmagamento das pontas das raízes entre lâmina e lamínula em uma gota de ácido acético 45%, as lâminas foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido, proporcionando a fixação dos materiais na lâmina e a retirada da lamínula. Depois de

preparadas, as lâminas foram postas para “envelhecer” por 3 dias em TA até serem utilizadas.

Cinco espécies foram submetidas tanto ao bandamento CMA/DAPI quanto à hibridização de DNA *in situ*. Nas demais, porém, foi aplicada apenas uma das técnicas.

Tabela 01: Relação das espécies estudadas, distribuídas em suas respectivas tribos.

ESPÉCIES	COLETOR
Astereae (2gen.; 2 spp.)	
<i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leotheca</i> (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho	Braga, K.R.R. 14; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Symphotrichum squamatum</i> (Spreng.) G.L. Nesom	Monge, M. 749; Braga, K.R.R.
Cichorieae (1 gen.; 1sp.)	
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Monge, M. 730; Braga, K.R.R 67, 86.
Coreopsidae (1 gen.; 2 sp.)	
<i>Bidens pilosa</i> L.	Monge, M. 744, 783; Braga, K.R.R.
<i>Bidens subalternans</i> DC.	Monge, M. 729; Braga, K.R.R 5.
Eupatorieae (3 gen.; 3 spp.)	
<i>Mikania</i> sp	Monge, M. 737; Braga, K.R.R.
<i>Praxelis kleineoides</i> (H.B.K.) R.M. King & H. Rob.	Monge, M. 782; Braga, K.R.R.
<i>Trichogoniopsis adenantha</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	Braga, K.R.R 58, 76.
Inuleae (1 gen.; 1 sp.)	
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	Monge, M. 779; Braga, K.R.R.
Mutisieae (1 gen. ; 1 sp.)	
<i>Chaptalia interegima</i> (Vell.) Burkart	Monge, M. 761; Braga, K.R.R.
Nassauvieae (1 gen.; 1 sp.)	
<i>Trixis antimenorrhoea</i> (Schränk) Kuntze	Braga, K.R.R. 18, 83; Monge, M.; Shimizu, G.
Neuroleneae (1 gen.; 1 sp.)	
<i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	Braga, K.R.R. 34, Monge, M.; Shimizu, G.
Tageteae (1 gen.; 1 sp.)	
<i>Tagetes minuta</i> L	Monge, M. 1106
Vernonieae (1gen.; 3spp.)	
<i>Vernonia diffusa</i> Less.	Braga, K.R.R. 40; Monge, M.; Shimizu, G.
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	Braga, K.R.R. 79
<i>Vernonia remotiflora</i> Rich.	Monge, M. 759; Braga, K.R.R.

Bandamento CMA/DAPI

O bandamento CMA/DAPI seguiu o protocolo de Guerra & Souza (2002). Primeiramente as lâminas envelhecidas foram coradas com uma gota de fluorocromo CMA (0,5mg/ml) e guardadas em câmara úmida escura durante 1h em TA. Depois as lâminas

foram lavadas com água destilada para retirada do excesso do fluorocromo e retirada das lamínulas. As lâminas foram secas rapidamente para adição do fluorocromo DAPI (2µg/ml). As lâminas foram novamente colocadas em câmara úmida escura por 30min em TA. Posteriormente foram lavadas com água destilada, com retirada das lamínulas, e secas rapidamente. Em seguida, as lâminas foram montadas em meio de montagem glicerol/Mellvaine (contendo MgCl₂) e mantidas em caixas na geladeira pelo menos por três dias, até serem analisadas em microscópio de Fluorescência

Técnica de Fluorecent *In Situ* Hybridisation (FISH)

No procedimento de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram utilizadas duas sondas, uma para hibridar com a região repetitiva em tandem do gene que codifica o DNA ribossomal 45S e outra o DNA ribossomal 5S. As sondas (D2, contendo o gene de DNA ribossomal 5S de *Lotus japonicus*; e R2, contendo a região do DNAr 18S–5.8S–25S de *Arabidopsis thaliana*) foram marcadas por nick translation (Bionick Gibco). As lâminas foram previamente tratadas em uma solução de RNase (RNase: 2xSSC, na proporção volumétrica de 1:100) a 37°C por 1h. Após esse tempo as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 10min e mergulhadas em paraformaldeído 4% por mais 10min em TA. Depois as lâminas foram lavadas novamente em 2xSSC. Em seguida as lâminas foram desidratadas em série alcoólica: 5min em etanol 70% e 5min em etanol 96%. Após esta etapa e com as lâminas secas, estas foram cobertas por uma mistura de hibridização contendo formamida 100%, Dextran 50%, 20xSSC, SDS 10% e sondas (45S e 5S). As lâminas, com a mistura de hibridização, foram desnaturadas a 75°C por 5min e renaturadas em gelo por 5min. Depois foram incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, as lâminas passaram por uma série de banhos (2xSSC, 0,1xSSC, 4xSSC/0,2%Tween) e, em seguida, pelo processo de detecção. As sondas foram detectadas por anticorpos ligados ao fluorocromo, sendo o DNAr 5S detectado por anti-digoxigenina-Rodamina (Roche Biochemicals, UK) e o DNAr 45S pela Avidina-FITC. O meio utilizado para montagem das lâminas foi DAPI/Vectashield. As lâminas foram mantidas em caixas na geladeira pelo menos por três dias, até serem analisadas em microscopia de fluorescência (Guerra, 2012).

Observação das lâminas e registro dos resultados

As lâminas obtidas a partir da aplicação da técnica de bandamento CMA/DAPI e FISH foram examinadas ao microscópio de fluorescência Olympus BX 51 e as imagens capturadas pelo aplicativo da Olympus. Depois as imagens foram analisadas no programa Adobe Photoshp versão 7.01. Foram analisadas 10 a 20 metáfases.

RESULTADOS

Bandamento CMA/DAPI

As 16 espécies estudadas estão distribuídas em 10 tribos e 13 gêneros. As tribos mais representadas foram Eupatorieae e Vernonieae, ambas com três espécies, seguidas das tribos Astereae e Coreopsidae, cada uma com duas espécies (Tabelas 01 e 02).

A técnica de bandamento CMA/DAPI revelou bandas CMA⁺ (bandas brilhantes com CMA) e DAPI⁻ (ausência de coloração com DAPI) em dezesseis espécies de Asteraceae (Tabela 02). Não foi observada a presença de banda DAPI⁺ (bandas brilhantes com DAPI).

Foram observadas variações no número e posição das bandas CMA⁺: dois (*Symphyotrichum squamatum*, *Sonchus oleraceus*, *Mikania* sp., *Praxelis klineoides*, *Trichogoniopsis adenantha*, *Vernonia diffusa*, *V. polyanthes* e *V. remotiflora*), quatro (*Conyza sumatrensis*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Chaptalia interregima*, *Trixis antimenorrhoea* e *Tagetes minuta*), oito (*Calea pinnatifida*) e 12 em *Pterocaulon alopecuroides* (Tabela 02). Todas as bandas CMA⁺ foram encontradas em cromossomos distintos (Figuras 01, 02 e 03).

Em relação à posição, as espécies apresentaram bandas CMA⁺ terminais e intersticiais, sendo que 80% das espécies estudadas apresentaram bandas terminais. Somente duas espécies apresentaram somente bandas intersticiais, *S. squamatum* (Figura 01e) e *Mikania* sp. (Figura 01a). Foi encontrado ainda um par de bandas CMA⁺ heromórfico (com banda terminal e intersticial) em *Trixis antimenorrhoea* (Figura 03b) (Tabela 02).

Distribuição de DNAr 5S e 45S

Foi possível mapear sítios de DNAr em cinco espécies de Asteraceae, *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* (2n= ca.54), *Bidens pilosa* (2n=72), *Mikania* sp. (2n=34), *Vernonia diffusa* (2n=34) e *V. remotiflora*. (2n=28) (Tabela 02). Em todas as espécies o número de sítios de DNAr 5S foi igual a dois, com exceção de *V. remotiflora* que apresentou três sítios (um em um cromossomo e dois em outro cromossomo) (Figura 04a). O número de sítios de DNAr 45S foi dois em *V. remotiflora*, *V. diffusa* e *Mikania* sp (Figura 04a,b,e), quatro em *B. pilosa* e seis em *C. sumatrensis* var. *leotheca* (Figura 04c) (Tabela 02).

Em relação à posição, os sítios de DNAr de 45S apresentaram preferencialmente posição terminal, com exceção da espécie *Mikania* sp. que apresentou posição intersticial. Os sítios de DNAr de 5S localizaram-se em posição intersticial (*B. pilosa*), terminal (*C. sumatrensis* var. *leotheca*, e *Mikania* sp) ou nas duas posições (*V. diffusa* e *V. remotiflora* (Tabela 02). A espécie *V. remotiflora* apresentou heteromorfismo para a posição do sítio de DNAr 5S.

No geral, as espécies apresentaram sítios de DNAr 5S e 45S localizados em cromossomos distintos, com exceção de *B. pilosa* que apresentou um par de sítios de DNAr 5S em sentença com um par de sítios de DNAr 45S (Figura 04d). Além disso, *V. remotiflora* apresentou dois sítios de DNAr 5S num mesmo cromossomo, mas em braços diferentes (Figura 4a). Foi possível observar um total de sete morfotipos cromossômicos a partir da aplicação da técnica de FISH (Figura 05). A forma/ou intensidade do sinal variou entre os cromossomos das espécies, às vezes aparecendo como faixas contínuas sobre as duas cromátides (*Vernonia diffusa*, *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* e *Mikania* sp.), ou como pontos sobre cada uma das duas cromátides (*Vernonia remotiflora* e *Bidens pilosa*).

Tabela 02- Distribuição de bandas CMA⁺/DAPI⁻ e sítios de DNAr 45S e 5S em espécies de Asteraceae da Serra do Japi, município de Jundiaí-SP. 2n= número cromossômico, segundo Braga (2014, Capítulo 1). t = terminal, i = intersticial.

ESPÉCIES	2n	CMA+	DAPI-	45S	5S
Astereae (2gen.; 2 spp.)					
<i>Conyza sumatrensis</i> var. <i>leothea</i> (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho	ca. 54	4 t	4t	6 t	2 t
<i>Symphotrichum squamatum</i> (Spreng.) G.L. Nesom	20	2 i	2 i	----	----
Cichorieae (1 gen.; 1sp.)					
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	32	2 t	2t	----	----
Coreopsidae (1 gen.; 2 sp.)					
<i>Bidens pilosa</i> L.	72	4 t	----	4 t	2 i
<i>Bidens subalternans</i> DC.	72	4t	----	----	----
Eupatorieae (3 gen.; 3 spp.)					
<i>Mikania</i> sp	34	2 i	----	2i	2t
<i>Praxelis kleinoides</i> (H.B.K.) R.M. King & H. Rob.	30	2t	2t	----	----
<i>Trichogoniopsis adenantha</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	20	2t	2t	----	----
Inuleae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	20	12 t	12t	----	----
Mutisieae (1 gen. ; 1 sp.)					
<i>Chaptalia interregima</i> (Vell.) Burkart	ca. 48	4 t	4t	----	----
Nassauvieae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Trixis antimenorrhoea</i> (Schrank) Kuntze	54	3t, 1i	3t, 1i	----	----
Neuroleneae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Calea pinnatifida</i> (R. Br.) Less.	38	8t	4t	----	----
Tageteae (1 gen.; 1 sp.)					
<i>Tagetes minuta</i> L	48	4t	4t	----	----
Vernonieae (1gen.; 3spp.)					
<i>Vernonia diffusa</i> Less.	34	2t	2t	2t	1t, 1i
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	34	2t	2t	----	----
<i>Vernonia remotiflora</i> Rich.	28	2t	2t	2t	2i, 1t

DISCUSSÃO

Os dados de bandamento CMA/DAPI e FISH (para as sequências de DNAr 45S e 5S) são inéditos para todas as espécies de Asteraceae estudadas.

Bandamento CMA/DAPI

Embora as espécies estudadas tenham apresentado variação em número cromossômico e em número de bandas CMA⁺/DAPI⁻, não foi observada uma relação direta entre essas variáveis. Por exemplo, as espécies *Conyza sumatrensis* var. *leothea* e *Bidens pilosa*, que têm número cromossômico maiores (2n= ca.54 e 2n=72, respectivamente), possuem quatro bandas CMA⁺, enquanto que a espécie *Pterocaulon alopecuroides*, com 2n= 20, possui 12 bandas CMA⁺/DAPI⁻, sendo todas terminais (Figura 02d) (Tabela 02).

No estudo com três espécies de *Vernonia* (*V. bardanoides*, *V. linearifolia* e *V. tomentella*), Oliveira *et al.* (2012a) encontraram duas a seis bandas CMA⁺, revelando que, embora as espécies tivessem em comum o mesmo número cromossômico (2n=32), houve variação quanto às características cariotípicas. Com isso, já haviam mostrado que não há uma relação direta entre número cromossômico e quantidade de bandas CMA⁺/DAPI. Contudo, os dados obtidos no bandamento CMA/DAPI foram importantes como caráter citotaxonômico para separar as espécies de *Vernonia*.

Nosso estudo revelou quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ em *Chaptalia interregima*. (2n=ca.48, Figura 03c), mesmo número relatado em *C. nutans* (L.) Pol. (2n=50) por Fregonezi *et al.* (2004). Isso sugere que em *Chaptalia* o número de bandas CMA⁺ tem se mantido constante, mesmo que o número cromossômico possa variar entre as espécies. Mudanças no número cromossômico parecem ter sido significativas para diversificação do grupo.

A ausência de bandas DAPI positivas (DAPI⁺) é comumente relatada em outros grupos vegetais, a saber, em Leguminosae (Souza & Benko-Iseppon, 2004), Rutaceae (Aurantioideae) (Guerra *et al.*, 2000). Contudo, há registro de Asteraceae com DAPI⁺ no estudo feito com o gênero *Cichorium* (Asteraceae). Dos cinco acessos estudados, a espécie *C. endivia* L. apresentou três pares de bandas CMA⁰/DAPI⁺, todas encontradas em cromossomos distintos (Bernardes *et al.*, 2013).

No que diz respeito à posição de bandas CMA⁺/DAPI⁻ (terminais e intersticiais), esse caráter não é exclusivo de Asteraceae, por ocorrer em diversos grupos de plantas, inclusive, monocotiledôneas. Por exemplo, em *Rhynchospora* (Cyperaceae), Vanzela & Guerra (2000) encontraram bandas CMA⁺ terminais e intersticiais em cromossomos holocêntricos, indicando que o padrão de distribuição da heterocromatina é semelhante aos de cromossomos monocêntricos (como nas Asteraceae aqui estudadas).

Hibridização *in situ* FISH

Roa & Guerra (2012) analisaram a distribuição e o número de sítios de DNAr 45S em 846 espécies de angiospermas. Verificaram que o número predominante de sítios é de dois a quatro por espécie. A distribuição dos sítios não é ao acaso, ocorrendo preferencialmente em braços curtos e nas regiões terminais. A amostragem de Roa &

Guerra (20120) incluiu 90 espécies de Asteraceae, distribuídas em 10 gêneros, e os resultados seguiram a tendência geral observada nas angiospermas. O mesmo foi observado para as espécies analisadas no presente trabalho, com exceção de *Mikania sp.*, onde os sítios eram intercalares.

O sítio de DNAr em forma de ponto, observada em *Vernonia remotiflora* e *Bidens pilosa* (Figura 05a,d), foi a única encontrada no estudo de Baeza & Schrader (2005) em espécies de *Haplopappus* e *Grindelia*, e a predominante no trabalho de Fiorin *et al.* (2013) com *Hypochaeris*. Mas quando comparado com outros trabalhos em Asteraceae, percebe-se que a forma mais comum do sítio de DNAr (Bernardes *et al.*, 2013; Baeza & Schrader, 2005; Reck, M. *et al.* 2011) é a de faixa contínua. Esse padrão foi observado em nosso estudo nas espécies de *V. diffusa*, *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* e *Mikania sp* (Figura 05b,c,e). A forma dos sítios pode representar mais um caráter citogenético, refletindo, provavelmente, o tamanho (número de repetições) das sequências presentes nos cromossomos das espécies em estudo.

A sintenia entre os sítios de DNAr 45S e 5S evidenciada em *Bidens pilosa* ($2n=72$) não é algo restrito a essa espécie de Asteraceae (Figura 05d). Garcia *et al.* (2007) estudando seis espécies de *Artemisia* (*A. argillosa*, *A. cana* ssp. *bolanderi*, *A. filifolia*, *A. filifolia*, *A. pygmaea*, *A. rígida*), encontraram co-localização de pelo menos um par de sítios de DNAr 45S e 5S em todas elas. Os autores sugeriram que a especiação do gênero na América do Norte não se deu por rearranjos cromossômicos, mas por eventos de poliploidia e hibridação, devido o padrão de distribuição de bandas ser constante dentro do gênero.

Na literatura há trabalhos nos quais os autores encontraram uma tripla co-localização entre sítios de DNAr 45S e 5S com bandas CMA+, como em *Cichorium*, para a espécie *C. endívia* L. (Bernardes *et al.*, 2013). Infelizmente, no presente estudo não foi aplicada metodologia sequencial que poderia detectar a co-localização de bandas CMA/DAPI e de sítios de DNAr em uma mesma célula. Provavelmente isso ocorra nas espécies estudadas, pois é frequente na literatura, para as plantas em geral e em Astreaceae, a menção de co-localização de sítios de DNAr 45S com bandas CMA⁺. Por exemplo, em *V. geminata*, houve sintenia da banda NOR, CMA⁺ e sítio 45S (Oliveira *et al.* 2012b) em dois cromossomos. Já em outras três espécies de *Vernonia*, em que há coincidência no número de bandas CMA⁺ e de sítios de DNAr 45S, apenas alguns estão co-localizados.

As espécies de *Vernonia* (*V. diffusa* e *V. remotiflora*) analisadas no nosso estudo pela técnica de FISH revelaram diferenças, especialmente para os sítios de DNAr 5S (Figura 05a,b). A presença de dois sítios de DNAr 45S foi constante entre elas, ocorrendo também em *V. geminata* (Oliveira et al 2012b) e *V. linearifolia* e *V. tomentella*. Entretanto, *V. bardanoides* apresentou seis sítios de DNAr 45S (Oliveira et al. 2012a).

A presença de apenas um par de sítios de DNAr 5S é comum para Asteraceae, a exemplo, com o gênero *Artemisia* (Torrell, 2003) e para outras famílias, a citar Leguminosae (Naganowska & Zielińska, 2002) e Musaceae (Osuji, Crouch & Heslop-Harrison, 1998).

CONCLUSÕES

- Nossos dados de bandamento CMA/DAPI e FISH são inéditos para todas as espécies estudadas nesse capítulo.
- A aplicação da técnica de bandamento CMA/DAPI e técnica de FISH revelaram diferenças cariotípicas entre as tribos e os gêneros estudados.
- A sintenia dos sítios de DNAr 45S e 5S evidenciada em *Bidens pilosa* ($2n=72$) não é algo restrito a essa espécie de Astereceae, já havendo sido relatado em *Artemisia*.
- Comparando nossos dados de bandamento CMA/DAPI e técnica de FISH com publicações anteriores, ainda não é possível definir um padrão para família Astereceae, tendo em vista que entre os grupos estudados há uma grande variabilidade. Para tanto, sugerem-se novos estudos citogenéticos para família, a fim de ampliar os dados e trazer novas elucidções em nível citotaxonômico.

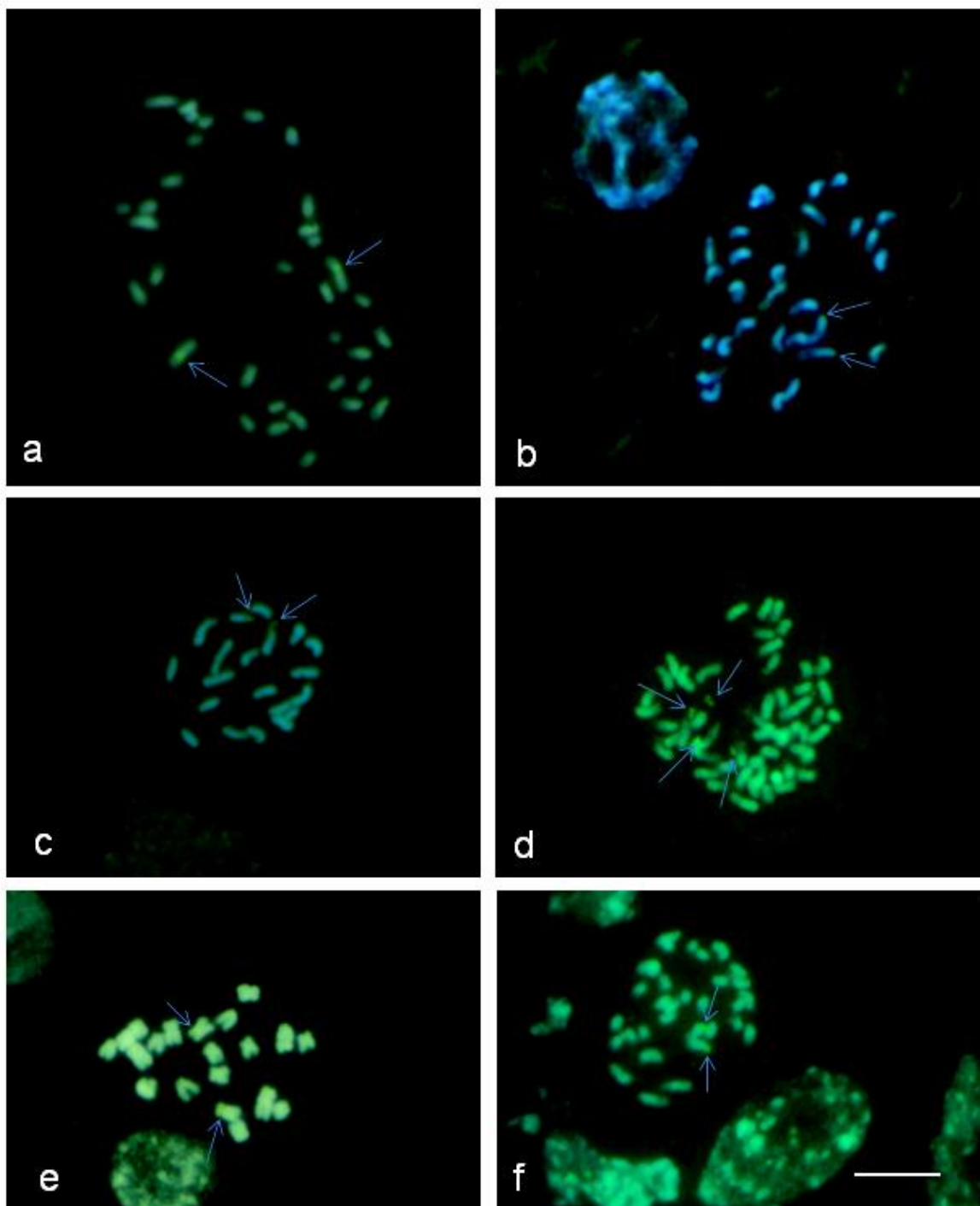


Figura 01- Bandamento CMA⁺ em Asteraceae: **a)** *Mikania sp* (2n=34), **b)** *Praxelis kleinoides* (2n=30), **c)** *Trichogoniopsis adenantha* (2n=20), **d)** *Conyza sumatrensis* var. *leotheica* (2n=ca. 54), **e)** *Symphyotrichum squamatum* (2n=20), **f)** *Sonchus oleraceus* (2n=32). Setas azuis CMA⁺. Barra branca = 10µm.

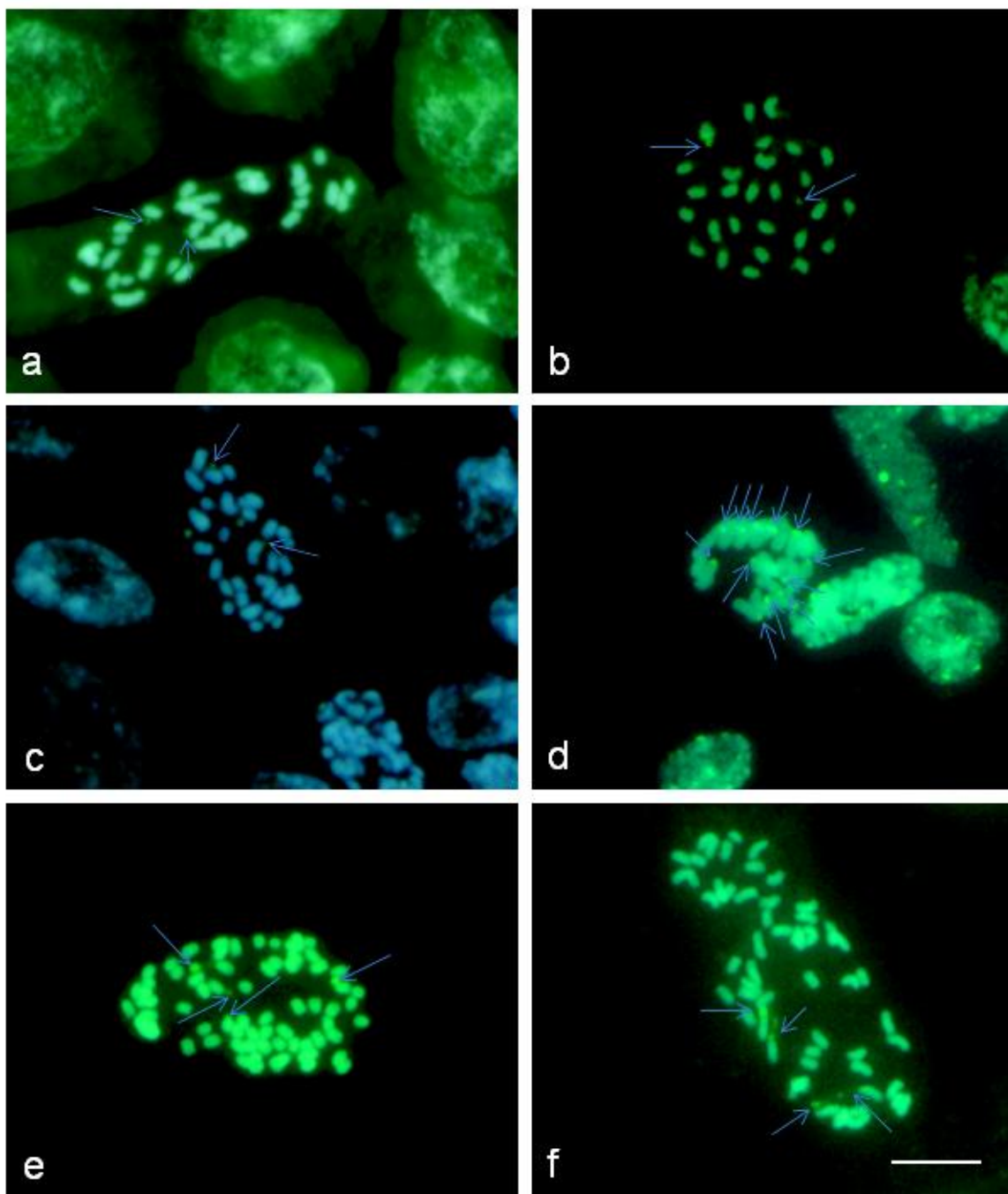


Figura 02 - Bandamento CMA⁺ em Asteraceae: **a)** *Vernonia polyanthes* (2n=34), **b)** *V. remotiflora* (2n=28), **c)** *V. diffusa* (2n=34), **d)** *Pterocaulon alopecuroides* (2n=20) **e)** *Bidens pilosa* (2n=72), **f)** *B. subalternans* (2n=72). Setas azuis CMA⁺. Barra branca = 10µm.

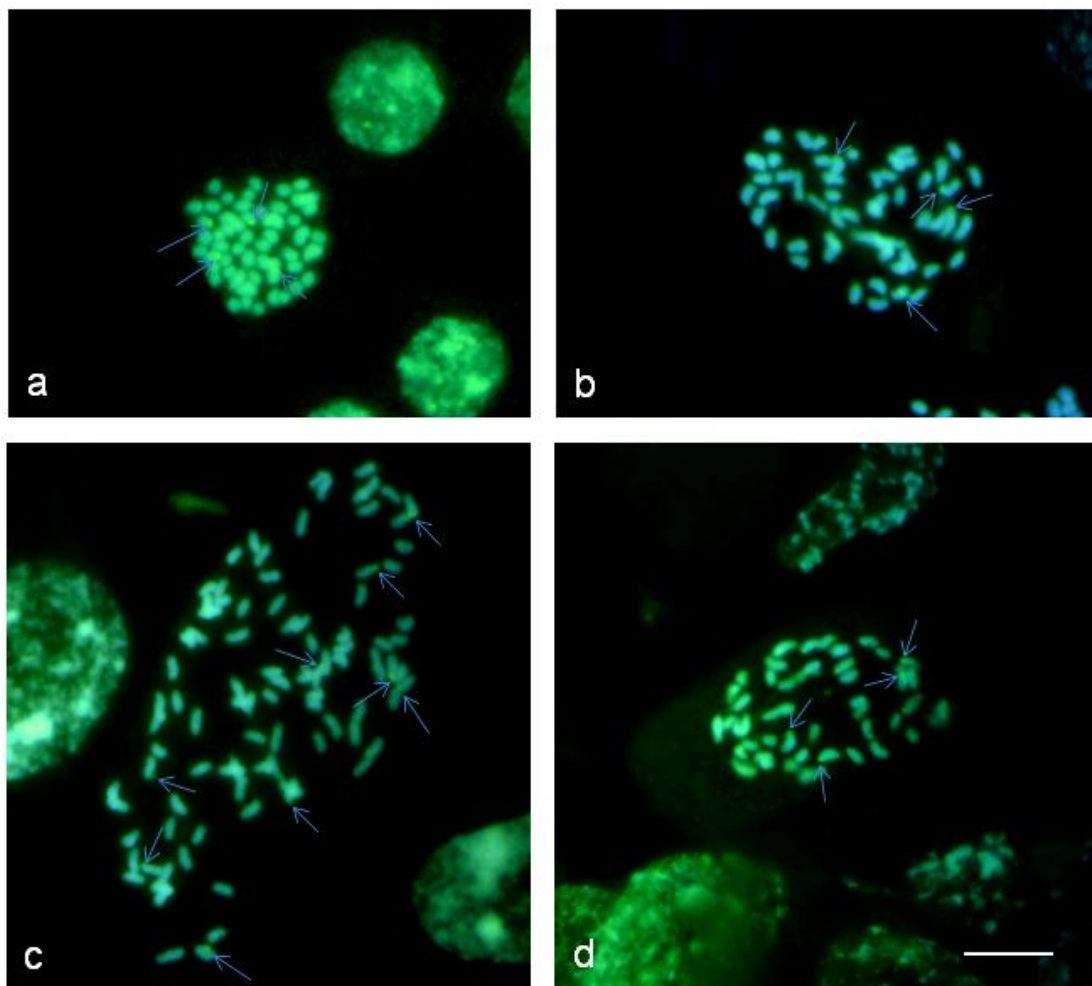


Figura 03 - Bandamento CMA⁺ em Asteraceae: **a)** *Chaptalia interregima* (2n=ca.48), **b)** *Trixis antimenorrhoea* (2n=54), **c)** *Calea pinnatifida* (2n=38), **d)** *Tagetes minuta* (2n=48). Setas azuis CMA⁺. Barra branca = 10μm.

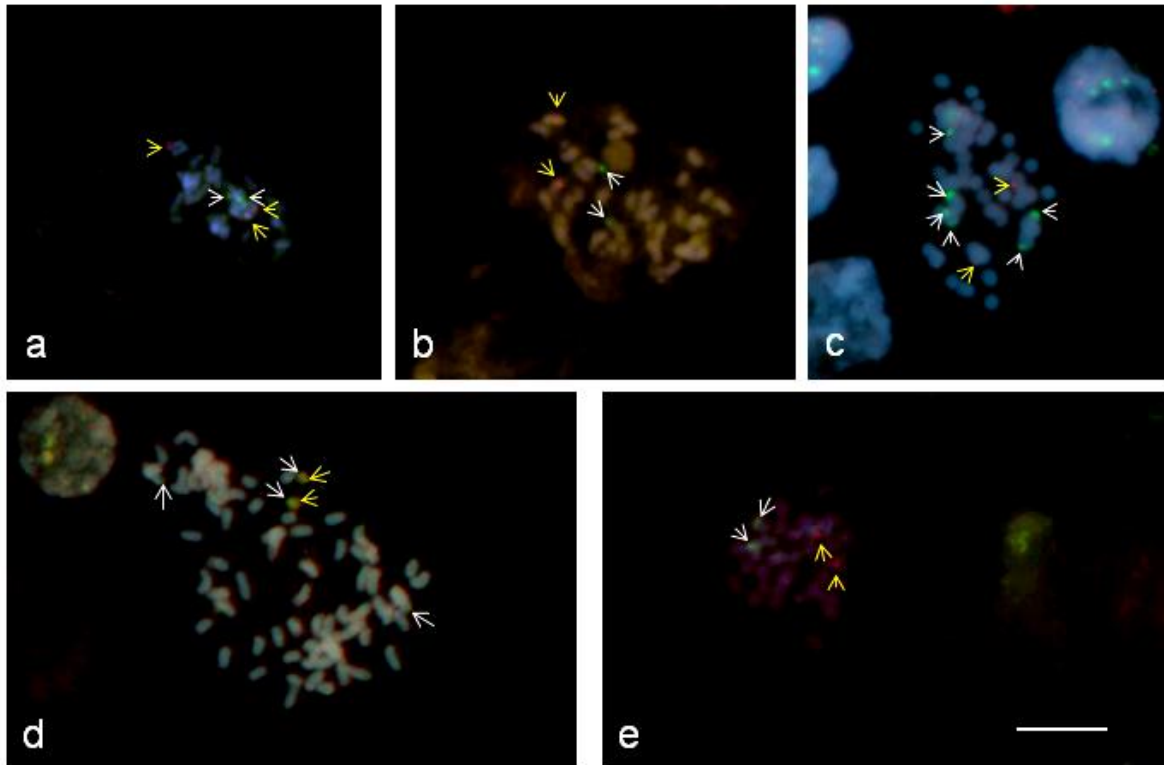


Figura 04– Metáfases encontradas em cinco espécies de Asteraceae a partir da aplicação da técnica de FISH e coradas com DAPI: **a)** *Vernonia remotiflora* ($2n=28$), **b)** *V. diffusa* ($2n=34$), **c)** *Conyza sumatrensis* var. *leotheica* ($2n=ca.54$), **d)** *Bidens pilosa* ($2n=72$), **e)** *Mikania* sp ($2n=34$). As setas amarelas indicam sítios DNAr 45S e as setas brancas indicam sítios DNAr 5S. Barra branca = $10\mu m$.

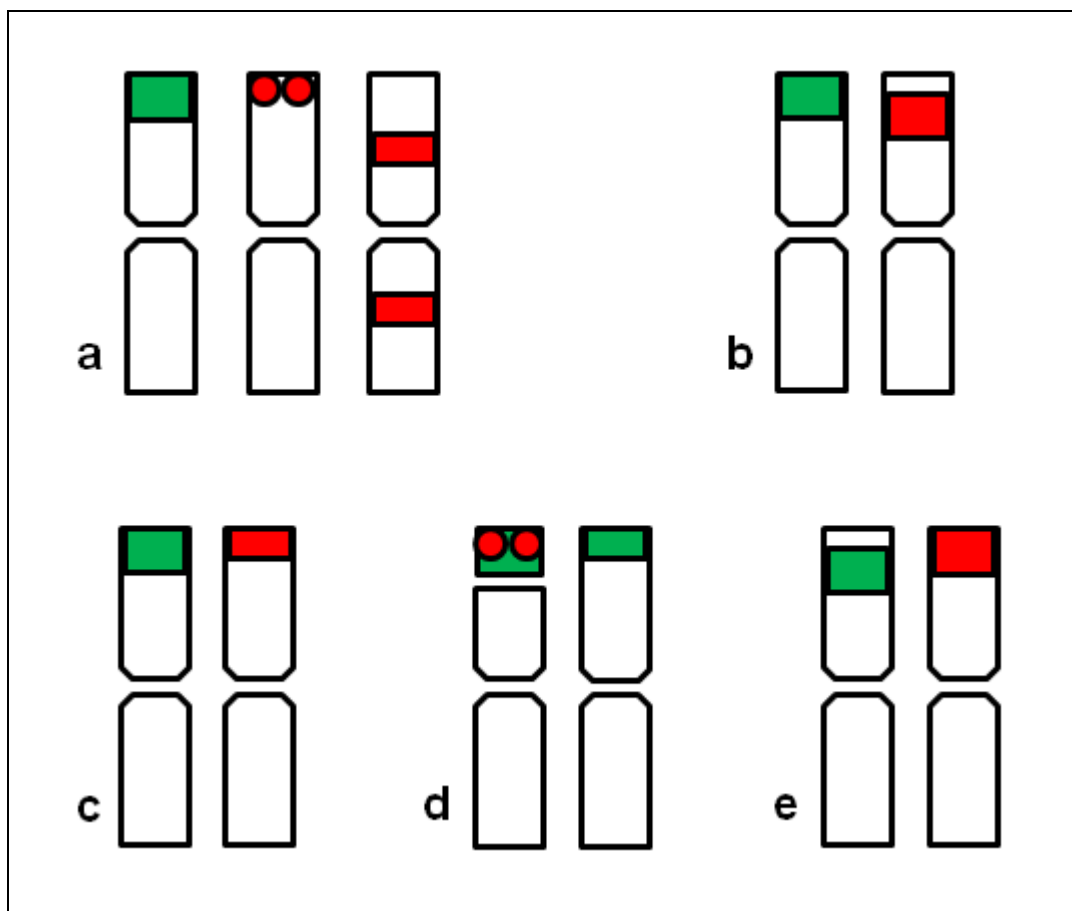


Figura 05– Tipos cromossômicos encontrados em cinco espécies de Asteraceae a partir da aplicação da técnica de FISH: **a)** *Vernonia remotiflora* (2n=28), **b)** *V. diffusa* (2n=34), **c)** *Conyza sumatrensis* var. *leotheca* (2n=ca.54), **d)** *Bidens pilosa* (2n=72), **e)** *Mikania* sp (2n=34). As faixas contínuas e pontos em vermelhos representam sítios de DNAr 5S e as faixas verdes representam sítios DNAr de 45S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baeza, C. & Schrader, O. 2005 Comparative karyotype analysis in *Haplopappus* Cass. and *Grindelia* Willd. (Asteraceae) by double FISH with rRNA specific genes. **Plant Syst. Evol** **251**: 161-172.
- Bernardes, E., C., S. *et al.* 2013. Intra- and interspecific chromosome polymorphisms in cultivated *Cichorium* L. species (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, **36**, 3, 357-363.
- Fiorin, F. G. *et al.* 2013. Karyotype studies on populations of two *Hypochaeris* species (*H. catharinensis* and *H. lutea*), Asteraceae, endemics to southern Brazil. **Genet. Mol. Res.** **12** (2): 1849-1858.
- Fregonezi, J. N. *et al.* 2006 Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (*Solanaceae*) based on the physical mapping of repetitive DNA. **Genetics and Molecular Biology** **29**: 97-104.
- Fregonezi, J. N.; Torezan, J. M. D.; Vanzela, A. L. L. 2004. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence in situ hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA3 banding. **Genetics and Molecular Biology** **27**: 223-227.
- Funk, V. A. *et al.* 2009. Classification of Compositae. In: _____. Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy: 171-189.
- Garcia, S. *et al.* 2007. Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. **Plant Syst. Evol** **267**: 79-92.

- Guerra, M. 2012. Citogenética molecular: protocolos comentados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (SBG).
- Guerra, M. *et al.* 2000. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae—A case of parallel Chromosomal Evolution. **American Journal of Botany** **87**: 735–747.
- Guerra, M. 1988. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. 1988.
- Guerra, M. & Souza, M. J. 2002. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto-SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.
- King, R. M.; Janaske, P. C.; Lellinger, D. B. 1955a. **Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Gardens** **54**.II.
- King, R. M.; Janaske, P. C.; Lellinger, D. B. 1955b. **Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Gardens** **54**. III
- Mazzella, C. *et al.* 2010. Karyological Features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): Stable Karyotypes, Low DNA Content Variation and Linkage of rRNA Genes. **Cytogenet Genome Res.** **128**:169–176
- Monge, M.; Semir, J. 2012. A família Asteraceae na Serra do Japi. *In*: VASCONCELLOS-NETO, J. *et al.* (Org.). **Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi: ecos de sua biodiversidade**.
- Naganowska, B.; Zielińska, A. 2002. Physical mapping of 18S-25S rDNA and 5S rDNA in *LUPINUS* via fluorescent *in situ* hybridization. **Cellular & Molecular Biology Letters** **2B**: 665 – 670.

- Oliveira, V. M. de; Semir, J.; Forni-Martins, E. R. 2012. Banding and FISH in three species of *Vernonia*, subsection *Macrocephalae* (Asteraceae, Vernonieae). **Plant Syst Evol.** **298** :969 - 974.
- Oliveira, V. M. *et al.* 2012. Karyotype characterization of two populations of *Vernonia geminata* (Asteraceae, Vernonieae) using banding and FISH techniques. **Genet. Mol. Res** **11**:. 4204-4212.
- Osuji, J. O. *et al.* 1998. Molecular Cytogenetics of *Musa* Species, Cultivars and Hybrids: Location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and Telomere-like Sequences. **Annals of Botany** **82**: 243-248.
- Reck, M. *et al.* 2011. Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae). **Plant Syst Evol.** **296**:231–243.
- Roa, F. & Guerra, M. 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology** **12**: 225
- Souza, M. G. C.; Benko-Iseppon, A. M. 2004 Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **144**: 181–191.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. 2005. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Torrell, M. *et al.* 2003. Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. **Plant Syst. Evol.** **239**: 141–153, may 2003.

- Vanezela, A. L. L.; Guerra, M. 2000. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genet. Mol. Biol.** 23: 453-456.
- Vanzela, A. L.L. ; Ruas, C. F.; Oliveira, M. F. & Ruas, P. M. 2002. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. **Genetica** 114: 105–111.
- Vasconcellos-Neto, J. *et al.* 2012. **Novos olhares, novos saberes sobre a Serra do Japi:** ecos de sua biodiversidade. Curitiba.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este trabalho contribuiu para o maior conhecimento cromossômico de diversos gêneros e espécies pertencentes à família Asteraceae, todas ocorrentes na Reserva Biológica Municipal (RBM) Serra do Japi (SP).
- As coletas para esse estudo incrementaram dez novas espécies de Asteraceae à lista de compostas já registradas para a Serra do Japi.
- No universo de 35 espécies que tiveram seus números cromossômicos determinados, seis novas contagens foram determinadas: *Symphyotrichum squamatum* (2n=20), *Critonia megaphylla* (2n=20), *Heterocondylus alatus* (2n=30), *Trichogoniopsis adenantha* (2n=20), *Gochnatia barrosii* (2n=44) e *Vernonia hilariana* (2n=34).
- Quatro contagens divergiram de contagens anteriores: *Bidens subalternans* (2n=72), *Praxelis kleineoides* (2n=30), *V. diffusa* (2n=34) e *Chromolaena odorata* (2n=30).
- Foram elaborados ideogramas inéditos para 14 espécies, apresentando predomínio de cromossômicos metacêntricos e submetacêntrico. No geral, o cariótipo pode ser

considerado moderadamente simétrico, uma vez que o valor de TF% variou de 29 a 44.

- As 16 espécies de Asteraceae submetidas à técnica de bandamento CMA/DAPI apresentaram bandas CMA⁺ (bandas brilhantes com CMA) e DAPI⁻ (ausência de coloração DAPI).
- A técnica de FISH revelou diferenças cariotípicas entre as cinco espécies estudadas: *Conyza sumatrensis* var. *leotheca*, *Bidens pilosa*, *Mikania* sp, *Vernonia diffusa* e *Vernonia remotiflora*., Os sítios de DNAr 45S variaram de dois a seis sítios e os de DNAr 5S de dois a quatro.
- Nossos dados de bandamento CMA/DAPI e FISH são inéditos para todas as espécies estudadas.
- Os cromossomos de Asterecae apresentaram diferenças em seus caracteres, tanto em nível de citogenética clássica (número cromossômico tamanho e morfologia), como em nível de citogenética molecular (bandas CMA/DAPI e número e localização de sítios de DNAr). Contudo, ainda não foi possível definir padrões e/ou possíveis tendências evolutivas para os grupos estudados, devido ao reduzido número de espécies amostradas. A ampliação de novas pesquisas citogenéticas poderá levar a conclusões mais consistentes para subsidiar estudos taxonômicos e de evolução cariotípica.